

ÜBER DIE KINETIK DER
NEUTRALEN UND ALKALISCHEN HYDROLYSE
SERINHALTIGER PEPTIDE

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Johann Wolfgang Goethe-Universität
zu Frankfurt am Main

vorgelegt von
Pablo Martinez Las Marias
aus Barcelona (Spanien)

1964

1965

Gedruckt mit Genehmigung
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main



Dekan: Prof.Dr. H.Lehmann
1. Gutachter: Prof.Dr. H.Hartmann
2. Gutachter: Prof.Dr. Th.Wieland
Tag der mündlichen Prüfung: 22.2.1965

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. H. Hartmann, bin ich für sein Interesse und die Förderung, welche er der vorliegenden Arbeit entgegenbrachte, dankbar verpflichtet.

Frau Dr. Ilse habe ich für die wertvollen Ratschläge und Anregungen, die sie mir auf radiochemischem Gebiet zuteil werden liess, besonders herzlich zu danken.

Mein Dank gilt ferner Herrn Dr. Heidberg für viele Ratschläge zur Synthese und Trennung der Peptide.

Auch möchte ich allen meinen Lehrern, die an meiner Ausbildung mitgeholfen haben, meinen Dank aussprechen.

I n h a l t s v e r z e i c h n i s

	Seite
I. Einführung	6
II. Wahl und Markierung der Peptide	10
Spezifische Aktivität	
III. Synthesen	14
1. Darstellung der Carbobenzoxym-aminosäuren	15
2. Darstellung der Aminosäure-benzylester	16
3. Darstellung der Cbo-Peptid-benzylester	18
4. Erster Weg zum Tripeptid. Abspaltung der Cbo-Gruppe	20
5. Zweiter Weg zum Tripeptid	22
6. Katalytische Hydrogenolyse der Cbo-Peptid-benzylester zu den Peptiden	23
IV. Analytische Trennmethoden	25
1. Papierchromatographie	27
a) Allgemeine Einführung	27
b) Arbeitsmethodik	31
c) Genauigkeit der chromatographischen Trennung	36
d) Chromatogramme	37
2. Elektrophorese	40
a) Allgemeine Grundlagen	40
b) Arbeitsmethodik	45
c) Pherogramme	49
V. Aktivitätsbestimmung	51
1. Geräte und Messbedingungen	51
2. Messgenauigkeit	58

	Seite
VI. Kinetik der Spaltung in neutralem Medium	60
1. Methodik der kinetischen Messungen	60
2. Theoretische Betrachtungen und Ergebnisse	67
VII. Kinetik der Spaltung in alkalischem Medium	80
1. Methodik der kinetischen Messungen	80
2. Ergebnisse und graphische Darstellungen	83
VIII. Diskussion der Versuchsergebnisse	92
IX. Zusammenfassung	107

Anhang : Aktivitätsmesswerte

Literaturverzeichnis

I. Einführung

Seit einigen Jahrzehnten haben die kinetischen Untersuchungen über die hydrolytische Spaltung einfacher Peptide dank des grossen Interesses, das diese Verbindungen als Modellsubstanzen für die Proteine besitzen, immer grössere Bedeutung erlangt.

Durch Studium der Peptidhydrolyse wurde zuerst versucht, die Struktur der Proteine aufzuklären und darüber hinaus, durch die quantitative Erfassung der Kinetik der Peptidspaltung Aufschlüsse über den Auf- und Abbau der Proteinbausteine zu erhalten. Ganz besonders hat man die verschiedene Festigkeit der Peptidbindungen unter den gewöhnlichen Bedingungen der Hydrolyse untersuchen wollen, denn ein Kriterium für die Stabilität einer Peptidbindung ist ihr Verhalten gegenüber der sauren oder alkalischen Hydrolyse. Bei den meisten Arbeiten jedoch wurde die hydrolytische Spaltung der Peptide im sauren, selten im alkalischen Medium durchgeführt. Ausserdem wurden im allgemeinen nur Dipeptide untersucht, weniger häufig Tripeptide.

Die ersten grundlegenden Arbeiten über die hydrolytische Spaltung von einfach gebauten Peptiden stammen von Levene ¹⁾, Abderhalden ²⁾ und Kuhn ³⁾. Diese Forscher untersuchten einige glycinhaltige Dipeptide. Die Untersuchungen von Levene und Steiger ⁴⁾ über die saure Hydrolyse von Dipeptiden führten zu dem Ergebnis, dass die Spaltungsgeschwindigkeit eine Funktion der an der Bindung beteiligten Gruppen ist. Synge ⁵⁾ bestätigte mit

seinen Ergebnissen über die saure Hydrolyse von Dipeptiden die Resultate von Levene. Eine Arbeit von Lawrence und Moore ⁶⁾ befasst sich wieder mit der Dipeptidspaltung. Die Untersuchungen von Abderhalden und Brockmann über die alkalische Peptidhydrolyse ergaben, dass die Spaltungsgeschwindigkeit unabhängig von der Art der verwendeten Base ist.

Bei allen Arbeiten sind die qualitativen Ergebnisse gleich, die Werte der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten weichen dagegen bei den verschiedenen Autoren stark voneinander ab. Die Arbeitsbedingungen (Peptid- und Säurenkonzentration sowie Versuchstemperatur) waren auch sehr verschieden. In nur wenigen Fällen ^{6,7)} wurde die Spaltung von Dipeptiden bei mehreren Temperaturen durchgeführt, so dass Aktivierungsenergien und Aktivierungsentropien berechnet werden konnten. In einigen Arbeiten wurde ein Reaktionsmechanismus diskutiert ^{8,9,10)}.

Der Verlauf der Hydrolyse wurde von den verschiedenen Autoren hauptsächlich mit folgenden analytischen Methoden verfolgt: Manometrische Bestimmung des N_2 der freien Aminogruppen nach Van Slyke, titrimetrische Bestimmung der freien Carboxylgruppe nach Sørensen und kolorimetrische Ninhydrinmethode nach Moore und Stein.

Diese Verfahren jedoch ermöglichen nur die quantitative Erfassung gewisser funktioneller Gruppen und damit den Gesamtverlauf der Hydrolyse, nicht aber die Erfassung der individuellen Anteile. Man kann also auf diese Weise nur den Gesamtverlauf der Spaltung beobachten, aber

nichts über den Spaltungsablauf der einzelnen Bindungen eines Tripeptids oder über den Mechanismus einer Simultanreaktion bzw. einer Konsekutivreaktion mit Zwischenprodukten erfahren. In diesen Fällen müssen demnach die Hydrolyseprodukte vor der Bestimmung getrennt werden, denn es gibt keine spezifischen Reagenzien für den Nachweis der Peptide und deren Spaltprodukte.

Die Trennung von chemisch und physikalisch so ähnlichen Stoffen, wie Peptiden und Aminosäuren, ist nur chromatographisch oder elektrophoretisch möglich. Da man bei diesen Verfahren auf mikroanalytische Arbeitsweise angewiesen ist, ist es zweckmässig, für die quantitative Bestimmung der getrennten Substanzen mit radioaktiven Isotopen zu arbeiten. Deshalb haben wir für unsere Untersuchungen die Papierchromatographie bzw. Elektrophorese zur Trennung und die Radioaktivität markierter Peptide zur quantitativen Erfassung herangezogen.

Verschiedene Aspekte der Peptidspaltung wurden in früheren Arbeiten dieses Institutes untersucht. H. Jung ¹¹⁾ beschäftigte sich mit der Kinetik der sauren Hydrolyse normaler Di- und Tripeptide, während J. Heintges ¹²⁾ die alkalische Hydrolyse der gleichen Peptide studierte. Später befasste sich J. Heidberg ¹³⁾ mit dem Problem der besonderen Reaktivität der Serinpeptide. Heidberg führte die Spaltung des Dipeptids Alanylserin in Salzsäure aus, d. h. unter den gleichen Versuchsbedingungen wie Jung, damit man beide Messergebnisse miteinander vergleichen konnte. Ausserdem wurde von Heidberg die

Hydrolyse des Glycylserins in reinem Wasser untersucht und dabei festgestellt, dass die Spaltung im Vergleich zu der der normalen Peptide ungewöhnlich schnell verläuft. In diesen Arbeiten wurden C-14-markierte Peptide verwendet, die Hydrolyseprodukte chromatographisch oder elektrophoretisch getrennt und auf Grund ihrer Radioaktivität bestimmt.

Um komparative Ergebnisse über den Einfluss der verschiedenen Radikalen auf die Stabilität der Peptidbindung der Serinpeptide zu erhalten, wurde in vorliegender Arbeit die Hydrolyse des Alanylserins und des Glycyl-Alanyl-Serins im neutralen Medium ausgeführt. Um das Bild der Kinetik der Serinpeptide in allen pHs zu vervollständigen, wurden ausserdem die Peptide Glycylserin und Alanylserin alkalisch hydrolysiert.

Zusammenfassend gesagt, das Ziel unserer Untersuchungen war es, die Kinetik der neutralen und alkalischen Spaltung geeigneter Serinpeptide zu bestimmen und zu deuten und auf Grund der erhaltenen kinetischen Daten die Aktivierungsenergien und Aktionskonstanten zu berechnen, sowie einen möglichen Reaktionsmechanismus ausfindig zu machen.

II. Wahl und Markierung der Peptide

Für die Auswahl und Markierung der zu synthetisierenden Peptide waren folgende Überlegungen massgebend: Erstens sollten die zu ermittelnden kinetischen Daten mit denen von H. Jung, J. Heintges und J. Heidberg zu vergleichen sein und zweitens musste die Trennung der Hydrolysatskomponenten nach chromatographischen bzw. elektrophoretischen Verfahren die quantitative Bestimmung sämtlicher Bestandteile ermöglichen.

Dies führte uns zur Wahl und Untersuchung folgender Peptide, die die Erwartungen erfüllten:

Glycyl^{*}-Alanin

Glycyl^{*}-Serin

Alanyl^{*}-Serin

Glycyl^{*}-Alanyl-Serin

Für die Konzentrationsbestimmung der Hydrolyseprodukte wurden die Peptide mit radioaktivem Kohlenstoff (C-14) markiert. Die radioaktive Indizierung erfolgte derart, dass die Konzentrationen jener Hydrolysebestandteile, die nicht experimentell zugänglich waren, rechnerisch erfasst werden konnten. Es musste also zunächst entschieden werden, welche der Aminosäuren in den Peptiden radioaktiv markiert werden sollten, um die Konzentrationsbestimmung aller Hydrolyseprodukte zu ermöglichen. Dazu mussten wir die chromatographischen bzw. elektrophoretischen Trennungsmöglichkeiten betrachten, um zu erfahren,

welche Hydrolyseprodukte voneinander trennbar waren.

Es war nicht nötig, alle Aminosäuren zu markieren. Man erkennt z. B. aus dem Chromatogramm der Spaltprodukte, die bei der neutralen Hydrolyse des Alanyl-Serins auftreten, dass die Zone des Alanins leicht von der gemeinsamen Zone des Alanylserins und des Serins getrennt werden kann. In diesem Fall ist eine Markierung des Alanins im Alanylserin notwendig und hinreichend; falsch wäre dagegen eine Markierung des Serins. Aus der experimentell ermittelten Aktivität des Alanins und der Gesamtaktivität lässt sich dann die Aktivität des Serins wie auch des Alanylserins mit Hilfe stöchiometrischer Beziehungen berechnen. Diese lauten für ein Dipeptid AB:

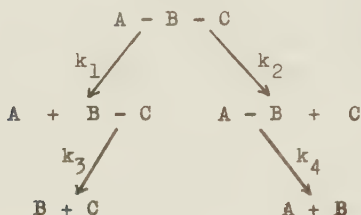
$$\begin{aligned}(AB)_0 &= (AB) + (A) \\ (A) &= (B)\end{aligned}$$

wobei $(AB)_0$ die Ausgangskonzentration des Dipeptids und (AB) , (A) , (B) , die Konzentrationen des Dipeptids AB bzw. der Aminosäuren A und B nach der Hydrolysezeit t , bedeuten.

Ebenso war anhand der Chromatogramme ersichtlich, dass im Glycylserin am besten das Glycin zu indizieren war, während im Glycylalanin die Markierung beliebig vorgenommen werden konnte.

Bei dem Tripeptid lassen sich auch die Konzentrationen sämtlicher Bestandteile teils experimentell teils rechnerisch erfassen. Bei der Spaltung eines Tripeptids ABC

treten sechs Hydrolyseprodukte auf, nämlich das noch unverbrauchte Tripeptid, die beiden Dipeptide AB und BC sowie die drei Aminosäuren A, B, C:



Aus den Zeitgesetzen für den Zerfall eines Tripeptids geht hervor, dass für die Ermittlung sämtlicher Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten k_i die Bestimmung der Konzentrationen einzelner, wenn auch nicht aller, Hydrolyseprodukte als Funktion der Zeit erforderlich ist. Man muss die Konzentration mindestens dreier Hydrolyseprodukte als Funktion der Zeit messen können; die Konzentration der anderen drei Hydrolyseprodukte lässt sich dann nach den Gesetzen der Stöchiometrie berechnen. Die für die Spaltung eines Tripeptids geltenden Zeitgesetze und stöchiometrischen Beziehungen sind in den Diplomarbeiten von H. Jung ¹⁴⁾ und J. Heintges ¹⁵⁾ angegeben.

Spezifische Aktivität

Für unsere Untersuchungen standen die an der Carboxylgruppe markierten DL-Alanin und Glycin mit den spezifischen Aktivitäten von 5,9 mC/mMol bzw. 19 mC/mMol zur Verfügung; beide radioaktiven Aminosäuren wurden von

"The Radiochemical Centre", Amersham, England, geliefert.

Diese hochaktiven Aminosäuren wurden mit inaktiven derart verdünnt, dass ihre Aktivität trotz Abnahme infolge der Elution und Zählrohrausbeute, doch für die kleinste zur Auszählung kommende Substanzmenge reichte.

Es ergab sich aus der Trennungskapazität der von uns angewandten Trennmethoden, dass die Trennung und Erkennung der Substanzzonen am besten war, wenn auf ein Chromatogramm bzw. Pherogramm das Hydrolysat von ca. $5 \cdot 10^{-6}$ Mol Ausgangspeptid gebracht wurde. Da die kleinste zur Auszählung gelangende Menge Aminosäure bzw. Peptid der Spaltung von ca. 2 % Ausgangspeptid entspricht, wird diese geringste Menge ca. 10^{-7} Mol betragen. Die untere Grenze auswertbarer Impulsraten des zu verwendenden Gerätes liegt bei 80 Imp/min und da von dem Zählrohr etwa 50 % der ausgesandten Strahlung nachgewiesen wird, sollten in 10^{-7} Mol Substanz mindestens 160 Zerfälle pro Minute stattfinden. Demnach sollte die spezifische Aktivität des Präparats mindestens

$$\frac{160 \text{ Zerf/min}}{10^{-7} \text{ Mol}} = 1,6 \cdot 10^9 \frac{\text{Zerf/min}}{\text{Mol}} \approx 0,7 \text{ mC/Mol}$$

betragen (1 Curie (C) = $2,22 \cdot 10^{12}$ Zerfälle/min) .

Wir stellten die spezifische Aktivität des Glycins und des Alanins auf etwa 1,5 mC/Mol ein; dafür verdünnten wir die aktiven Aminosäuren mit der entsprechenden Menge inaktiver in wässriger Lösung.

III. Synthesen

Da die Ausbeute bei den Synthesen wegen des teuren C-14 möglichst günstig sein sollte, mussten wir zuerst unter den Syntheseverfahren für Peptide dasjenige ausfindig machen, bei dem die Peptide mit der geringsten Stufenzahl darzustellen waren. Wir wählten deshalb die Wielandsche Anhydridmethode ¹⁶⁾; bei diesem Verfahren ist die Zahl der zur Darstellung eines Peptids notwendigen Zwischenstufen am kleinsten, so dass zu erwarten war, dass die Gesamtausbeute besser sei.

Die ersten Peptidsynthesen wurden von E. Fischer ohne Schutz der Aminogruppen durchgeführt, weil man damals methodisch nicht in der Lage war, die bekannten Schutzgruppen nachträglich abzuspalten, ohne gleichzeitig die Peptidbindung zu lösen.

Diese Grenze der chemischen Methodik wurde 1932 durch die Arbeiten von M. Bergmann und L. Zervas ¹⁷⁾ überschritten. Diese Autoren führten zum Schutz der Aminogruppen den Carbobenzoxyster (Cbo-Rest) ein, der sich durch seine leichte katalytische Abspaltbarkeit auszeichnet. Es wird deshalb seit seiner Einführung bevorzugt mit ihm gearbeitet.

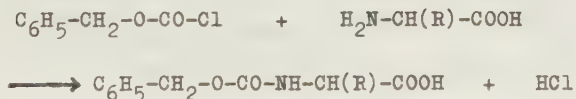
Da aber die zu knüpfenden Aminosäuren gleichzeitig eine Amino- und eine Carboxylgruppe im Molekül haben, muss man, um eine gelenkte Verknüpfung zu schaffen, die zweite funktionelle Gruppe im Aminosäuremolekül blockieren, denn sonst würde jede Aktivierung einer Gruppe sofort zu

einer unkontrollierbaren Polykondensation ausarten. Durch Blockierung der einen funktionellen Gruppe hingegen wird die andere frei verfügbar.

Wir verwendeten zum Schutz der Aminogruppen den oben erwähnten Carbobenzoxyster und für die Carboxylgruppen den Benzoxyster. Beide Schutzgruppen können nachträglich ohne Angriff auf die empfindliche Peptidbindung durch katalytische Hydrierung leicht wieder entfernt werden.

1. Darstellung der Carbobenzoxy-aminosäuren

Für die Darstellung der Cbo-Aminosäuren geht man von dem Carbobenzoxychlorid (Chlorameisensäurebenzylester) aus, der in wässriger, alkalischer Suspension nach der Art der Schotten-Baumann-Reaktion mit der NH_2 -Gruppe der Aminosäuren reagiert:



Das dazu notwendige Carbobenzoxychlorid wurde aus Benzylalkohol und Phosgen hergestellt:



Cbo-Chlorid 18)

In 500 ml über Natrium destilliertes Toluol wird unter Eiskühlung 1-2 Stunden lang Phosgen eingeleitet. Wenn 109 g Phosgen absorbiert sind, werden 108 g trockener Benzylalkohol zugegeben und dann lässt man das Ganze einige Stunden stehen. Danach werden die flüchtigen Bestandteile (HCl, Phosgen, Toluol) im Vakuum abdestilliert, bis der Rückstand ca. 200 g wiegt. Der Rückstand bestand aus Cbo-Chlo-

rid und nicht umgesetztem Benzylalkohol.

Cbo-Aminosäure

Zu 0,2 Mol Aminosäure, in 100 ml 2n NaOH gelöst, wurden unter Eiskühlung und gutem Vibrieren gleichzeitig 0,2 Mol Cbo-Chlorid und 50 ml 4n NaOH zuge-
tropft. Nach beendeter Reaktion wurde die wässrige
Schicht mit Äther extrahiert (ausgenommen bei dem
Cbo-Serin) und mit HCl unter Eiskühlung bis zum Um-
schlag von Kongorot angesäuert, wobei die Cbo-Amino-
säure ausfiel.

Das Cbo-Glycin und das Cbo-Alanin wurden aus Chloro-
form/Petroläther, das Cbo-Serin aus Essigester umkris-
tallisiert.

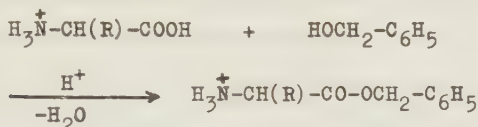
	Ausbeute	Fp.
Cbo-Glycin	85% d.Th.	120°C
Cbo-Alanin	90%	114°C
Cbo-Serin	60%	124°C

2. Darstellung der Aminosäure-benzylester

Die Aminosäuren werden zum Schutz ihrer Carboxylgruppe
verestert. Ausserdem hat die Verwendung des Aminosäure-
esters noch den Vorteil, dass bei der später durchzufüh-
renden Synthese des Cbo-Peptidesters eine Abtrennung des
letzteren von den anderen Stoffen auf Grund seines neu-
tralen Charakters möglich ist.

Anstatt des allgemein angewandten Methylesters der Amino-
säure wird der Benzylester vorgezogen, da bei der an-
schliessenden Hydrierung mit Palladium-Katalysator der
Benzylester sich gemeinsam mit dem Cbo-Rest abspalten
lässt, während der Methylester erst verseift werden muss;
es bleibt also eine Stufe erspart. Ausserdem bleibt der
Benzylrest bei der spezifischen Abspaltung des Cbo-Restes
mit Bromwasserstoff/Eisessig unberührt.

Wir stellten die Benzylester der Aminosäuren nach dem Verfahren von Miller und Waelsch ¹⁹⁾ dar, d. h. Umsetzung der Aminosäure mit Benzylalkohol im sauren Medium mit p-Toluolsulfonsäure als Katalysator:



Das gebildete Wasser wird azeotropisch mit überschüssigem Benzylalkohol im Vakuum abdestilliert.

Alanin-Benzylester-p-toluolsulfonat

0,1 Mol Alanin und 0,11 Mol p-Toluolsulfonsäurehydrat (Merck, f. Chr.) werden in 50 ml bidestilliertem Benzylalkohol gelöst. Der Benzylalkohol wird im Ölbad bei 115°C vakuumdestilliert. Nach Zugabe von weiteren 0,5 g p-Toluolsulfonsäurehydrat und 30 ml Benzylalkohol wird erneut destilliert. Der heisse ölige Rückstand wird in eine Porzellanschale gegeben und nach dem Erkalten mit absolutem Äther verrieben, bis Kristallisation eintritt. Dann wird abfiltriert, mit Äther gewaschen und getrocknet. Keine Umkristallisation nötig.

Ausbeute: 85 % Fp. 112°C

Serin-Benzylester-p-toluolsulfonat

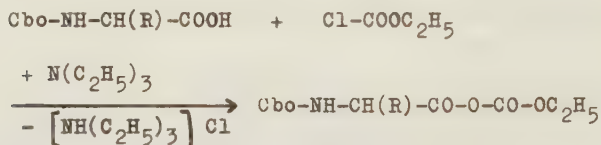
Die Darstellung gelang analog der des Alanin-Benzylester-p-toluolsulfonats. Der ölige Rückstand zeigte aber nur eine sehr kleine Kristallisationsneigung. Die Kristallisation des Esters gelang, indem man in den heissen Rückstand vorsichtig absoluten Äther eintropfte, gerade so viel, dass keine Ausscheidung weisser Öltröpfchen stattfand. Im Eisschrank stehengelassen, kristallisierte die Substanz nach einigen Stunden. Umkristallisation aus Methylenchlorid/abs. Äther.

Ausbeute: 60 % Fp. 96°C

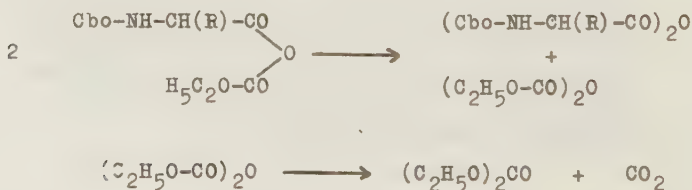
3. Darstellung der Cbo-Peptid-Benzylester

Die Knüpfung der Peptidbindung erfolgte nach der oben erwähnten Anhydridmethode von Wieland ¹⁶⁾.

Sehr günstig zur Aktivierung der Cbo-Aminosäuren an der Carboxylgruppe erwies sich der Chlorameisensäureäthylester. Das gemischte Anhydrid entsteht in indifferenten Lösungsmitteln (Tetrahydrofuran) in Gegenwart von tertiären Basen (Triäthylamin) bei -10°C :

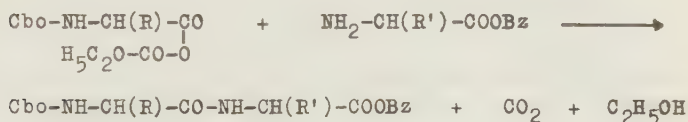


Es ist dabei sehr wichtig, dass man die Temperatur unter 0°C hält, da sonst eine Disproportionierung des gemischten Anhydrids erfolgt, was sich durch eine CO_2 -Entwicklung äussert. Bei dieser Disproportionierung bilden sich das symmetrische Aminosäureanhydrid und der symmetrische Kohlensäurehalbest, welcher letzterer unter CO_2 -Abspaltung in den Kohlensäurediester sofort übergeht:



Das entstandene gemischte Anhydrid wird mit dem Aminosäurebenzylester im gleichen Lösungsmittel geknüpft.

Der im Molekül des gemischten Anhydrids vorhandene Äthylameisensäure-Rest ruft eine Positivierung des Carboxylkohlenstoffes der Aminosäure hervor, was die Anlagerung des Stickstoffes des Aminosäurebenzylesters erleichtert, so dass die Reaktion als nukleophiler Angriff des letzteren angesehen werden kann:



Nach beendeter Synthese ist die Abtrennung des Cbo-Peptidbenzylesters von den anderen Substanzen dank seines neutralen Charakters möglich. Die Ausgangsstoffe werden durch saures und durch alkalisches Ausschütteln entfernt.

Cbo-Dipeptid-benzylester

Zu 0,02 Mol Cbo-Aminosäure in 40 ml abs. Tetrahydrofuran (einige Tage über KOH getrocknet und über Na destilliert und aufbewahrt) werden 0,02 Mol trockenes Triäthylamin (über KOH destilliert und aufgefangen) zugegeben. Nach Abkühlung auf -15°C (Eis/Kochsalz) wird die Mischung mit 0,02 Mol Chlorameisensäureäthylester versetzt. Es darf dabei keine CO_2 -Entwicklung stattfinden. Beim Rühren fällt das Aminsalz aus. Man lässt eine Stunde stehen unter Aufrechterhaltung der Temperatur bei -15°C . Dann werden 0,02 Mol Aminosäurebenzylester-p-toluolsulfonat und 0,02 Mol Triäthylamin in 50 ml Methylenchlorid gelöst (dabei wird der Aminosäurebenzylester von dem p-Toluolsulfonatrest befreit) und in die Mischung des Anhydrids gegossen. Die Lösung wird tüchtig geschüttelt und langsam auf Zimmertemperatur gebracht, wobei eine kräftige CO_2 -Entwicklung stattfindet. Nach Aufhören der CO_2 -Entwicklung wird das Tetrahydrofuran im Vakuum abdestilliert, wobei der Cbo-Peptid-benzylester ausfällt. Der Rückstand in wenig Wasser wird mit Essigester extrahiert, der Essigesterauszug mit 1n HCl und 5%igem Natriumbicarbonat geschüttelt und über festem Natriumsulfat getrocknet. Der Essigester wird abfiltriert und im Wasserbad bei 40°C vakuumdestilliert.

Der ölige Rückstand wird aus Chloroform/Petroläther umkristallisiert.

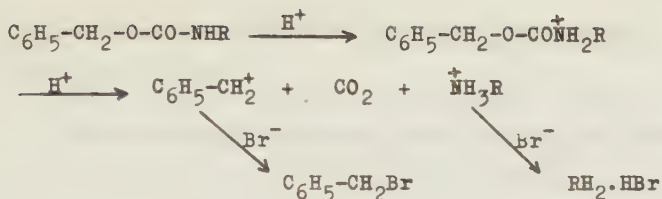
	Ausbeute	Fp
Cbo-Glycyl-Alanin-Benzylester	60 %	87°C
Cbo-Glycyl-Serin-Benzylester	50 %	139°C
Cbo-Alanyl-Serin-Benzylester	65 %	117°C

4. Erster Weg zum Tripeptid. Abspaltung der Cbo-Gruppe

Der Aufbau eines Tripeptids ABC ist von links nach rechts (AB + C) oder umgekehrt von rechts nach links (A + BC) möglich. Im allgemeinen ist die Darstellung von rechts aus vorteilhafter. Da aber das Tripeptid Glycyl-Alanyl-Serin in der Literatur noch nicht beschrieben war, stellen wir es von beiden Seiten ausgehend her. Bei unserem Tripeptid erwies sich jedoch, dass die Darstellung von links aus besser reproduzierbare Ergebnisse gab, als die von rechts aus durchgeführte.

Zum Aufbau des Tripeptids von rechts her muss man den Cbo-Rest des entsprechenden Cbo-Dipeptid-Benzylesters abspalten. Die Entfernung des Cbo-Restes erfolgt durch Einwirkung einer Lösung von HBr in Eisessig ²¹⁾, jedoch gelingt sie hier nur unter besonderen Massnahmen ²²⁾. Der Benzylrest bleibt bei dieser schonenden Behandlung unberührt.

Die Reaktion wird als eine durch Protonen katalysierte Solvolyse angesehen. Der erste Schritt ist die Addition des Protons an ein nukleophiles Zentrum und dann folgt der Angriff des Br⁻ auf die Benzyl- und Aminogruppe:



Bromwasserstoff in Eisessig 21,22)

Zur Darstellung einer 36%igen HBr/Eisessiglösung (ca. 20 g HBr in 60 ml Eisessig) lässt man 13 ml Br₂ in ein Gemisch von 40 ml Tetralin und 1 g Eisenspänen eintropfen. Der sofort entstehende HBr wird mit einem N₂-Strom durch zwei Kühlgefäße (-60°: Trockeneis/Alkohol) und einen mit P₂O₅ gefüllten Trockenturm in 60 ml gekühlten Eisessig geleitet, der vorher mit 1% Essigsäureanhydrid unter Feuchtigkeitsausschluss destilliert worden ist.

Alanyl-Serin-benzylester-hydrobromid

0,02 Mol Cbo-Alanyl-Serin-benzylester werden unter Feuchtigkeitsausschluss mit 8 - 10 ml 36%igem HBr/Eisessig überschichtet. Die Reaktion beginnt sofort unter CO₂-Entwicklung, wobei der Ester in Lösung geht. Unter gelegentlichem Schütteln ist die Reaktion nach einer halben Stunde beendet. Das gebildete Dipeptid-ester-hydrobromid wird mit 200 ml abs. Äther ausgefällt. Der ölige Niederschlag wird zum Kristallisationsbeginn mit abs. Äther digeriert. Im Eisschrank kristallisiert die Substanz vollständig. Umkristallisation aus kochendem abs. Alkohol/abs. Äther. Da wahrscheinlich bei diesem Peptid eine teilweise Umlagerung der N-Peptidyl- in die O-Peptidylverbindung stattfindet, ist die Aufarbeitung langwieriger. Man erhält aber nach mehreren Umkristallisationen aus Alkohol/Äther ein Rohprodukt, das auf Ton über KOH und P₂O₅ im Vakuumexikator getrocknet wird.

Ausbeute 50 %

Cbo-Glycyl-Alanyl-Serin-benzylester

Die Darstellung dieses Cbo-Tripeptid-Benzylesters wird aus Cbo-Glyzin und Alanyl-serin-Benzylester-hydrobromid nach der Anhydridmethode wie bei den Cbo-Dipeptid-benzylestern ausgeführt. Man kann direkt das in der vorherigen Synthese erhaltene Rohprodukt verwenden, weil die O-Peptidylverbindung bei der Extraktion der Essigesterlösung mit HCl von dem Cbo-Tripeptid-benzylester entfernt wird.

Ausbeute 30 %

Fp 122°C

5. Zweiter Weg zum Tripeptid

Für die Darstellung des Tripeptids Glycyl-Alanyl-Serin von links her geht man von Cbo-Glycyl-Alanin aus und knüpft es mit Serin-benzylester.

Da bei diesem Weg die Synthese des Dipeptid-benzylesters wegfällt, wird die teilweise Umlagerung, die in diesem bei der Einwirkung von Bromwasserstoff stattfindet, umgangen. Die Ausbeuten lagen auch höher. Deshalb benutzten wir bei der Synthese des Tripeptids mit radioaktiver Aminosäure nur diesen zweiten Weg.

Cbo-Glycyl-Alanin

Die Darstellung dieser Substanz wurde wie die der Cbo-Aminosäuren ausgeführt.
Zu 0,02 Mol Glycyl-Alanin in 20 ml 1n NaOH wurden unter Eiskühlung und gutem Vibrieren gleichzeitig 0,02 Mol Cbo-Chlorid und 5 ml 4n NaOH zugetropft. Die Lösung wurde einmal mit Äther extrahiert und mit konzentriertem HCl bis zum Kongorot angesäuert, wobei das Cbo-Glycyl-Alanin ausfiel. Es wurde aus Chloroform/Petroläther umkristallisiert.

Ausbeute 70 % Fp 176°C

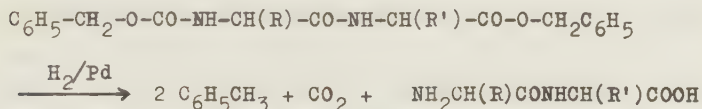
Cbo-Glycyl-Alanyl-Serin-benzylester

Diese Verbindung wurde durch Knüpfung von Cbo-Glycyl-Alanin und Serin-benzylester nach der oben erwähnten Wielandschen Anhydridmethode dargestellt. Die Ausbeute war besser als die der Darstellung der gleichen Substanz über den anderen Weg, d. h. aus Cbo-Glycin und Alanyl-Serin-benzylester-hydrobromid.

Ausbeute 50 % Fp 122°C

6. Katalytische Hydrogenolyse der Cbo-Peptid-benzyl- ester zu Peptiden

Durch die schonenden Bedingungen der katalytischen Hydrogenolyse ist es nun möglich, die Cbo- und Benzylgruppen gleichzeitig abzuspalten. ²⁰⁾ Durch diese mit Palladium katalysierte Hydrierung werden die unangenehmen Bedingungen einer Verseifung umgangen.



Palladium-Katalysator ^{14,15)}

In 1 Liter warmes Wasser (70°) werden 5 g Natriumformiat gelöst und danach 1 g fein gepulvertes PdCl₂ zugegeben. Die Lösung wird 12 Stunden stehen gelassen. Das gebildete schwarze Palladium wird abgesaugt und unter Wasser aufbewahrt.

Herstellung der Peptide

0,01 Mol Cbo-Peptid-benzylester werden in 160 ml Methanol p.A. gelöst und in eine mit Wasserstoff vorgespülte Hydrierbirne gegeben. Dazu kommen 0,5 ml Eisessig, 2-4 ml Wasser (um das entstehende Peptid in Lösung zu halten) und 0,6 g Pd-Katalysator. Jetzt wird während 5 - 8 Stunden ein kräftiger H₂-Strom durch die Lösung geleitet. Der Verlauf der Hydrogenolyse wird an der CO₂-Entwicklung kontrolliert, die mit Barytwasser durch die Bildung unlöslichen Bariumkarbonats nachgewiesen wird. Nach 2 - 3 Stunden gibt man nochmals 0,2 g Palladium-Katalysator zu. Nach vollzogener Reaktion wird die methanolische Lösung filtriert (vorher H₂ durch N₂ verdrängen!) und zur Trockene vakuumdestilliert. Der Rückstand wird in wenig Wasser gelöst, filtriert und mit abs. Alkohol/Äther ausgefällt. Umkristallisation aus Wasser/abs. Alkohol.

	Ausbeute	Fp
Glycyl-Alanin	70 %	221 °C
Glycyl-Serin	65 %	198 °C
Alanyl-Serin	65 %	211 °C
Glycyl-Alanyl-Serin	60 %	230 °C

Alle Synthesen der oben angeführten Stoffe wurden, bevor man sie mit den radioaktiven Aminosäuren durchführte, zuerst mit inaktiven Substanzen gut eingeübt.

Da für unsere kinetischen Untersuchungen die Peptide sehr rein sein mussten, wurden sie, trotz unvermeidlicher Verluste, mehrmals umkristallisiert. Ihre Reinheit wurde chromatographisch, elektrophoretisch und durch Elementaranalyse nachgeprüft. Die elementare C,H,N-Bestimmung wurde im mikroanalytischen Laboratorium Schöller, Kronach, ausgeführt; die gefundenen Werte stimmten mit den berechneten befriedigend überein ²⁴⁾. Alle synthetisierten Peptide waren auch chromatographisch und elektrophoretisch einheitlich.

IV. Analytische Trennmethoden

Für die Trennung von Substanzen, die ursprünglich in der gleichen Phase vorliegen, gibt es grundsätzlich zwei mögliche Verfahrensarten. Diese sind Verteilung zwischen zwei verschiedenen Phasen oder Trennung durch Diffusionsmethoden bei Einwirkung von Temperatur-, Druck- oder Konzentrationsgradienten, in Zentrifugal-, elektrischen oder magnetischen Feldern; weiterhin kann man durch chemische Methoden die physikalischen Eigenschaften der zu trennenden Stoffe so modifizieren, dass die Leistungsfähigkeit dieser beiden grundlegenden Verfahren gesteigert wird.

Ganz besonders in den letzten Jahren sind solche Verfahren zu steigender Bedeutung gelangt, in denen die Einstellung eines Gleichgewichtes zwischen den Phasen "im Gegenstrom" oft wiederholt wird, so dass ein kleiner Anreicherungsfaktor dennoch zu guter Trennung führt (Destillation über Kolonnen, Gegenstromverteilung nach Craig, Thermodiffusion im Trennrohr nach Clusius, Chromatographie, Elektrophorese).

Zur Trennung des in unserem Falle in wässriger Phase vorliegenden Gemisches von Aminosäuren und Peptiden haben wir uns der Papierchromatographie und der Elektrophorese bedient. Nach vollzogener Trennung der Gemischbestandteile erfolgte die Feststellung der Lage derselben auf dem Papier mittels leichten Besprühens mit Farbreakleklern, darunter besonders Ninhydrin, oder, noch

besser, auf Grund ihrer Fluoreszenz in ultraviolettem Licht. Nach Festlegung der Zonen wurden die einzelnen Substanzen mit bidestilliertem Wasser aus dem Papier eluiert.

Die quantitative Bestimmung der Substanzen wurde auf Grund ihrer Radioaktivität mit Hilfe geeigneter radiochemischer Methoden durchgeführt.

Auf die Grundlagen, praktische Ausführung und Auswertung dieser von uns benutzten Verfahren sei nachstehend eingegangen.

1. Papierchromatographie ^{25,26)}

a) Allgemeine Einführung.

Selten hat eine Methode so revolutionierend auf weite Gebiete der analytischen Chemie gewirkt und sich derart fruchtbar erwiesen, wie das im Jahre 1944 von den englischen Forschern Consden, Gordon und Martin ²⁷⁾ gefundene Verfahren der Papierchromatographie.

Die grosse Bedeutung dieser Methode für die analytische Chemie liegt darin, dass sie völlig neue Perspektiven eröffnete, dort wo die "klassischen" analytischen Verfahren an einer nicht mehr zu überschreitenden Grenze angekommen waren. Das ist vor allem der Fall bei chemisch und physikalisch besonders ähnlichen Stoffen, wie Peptiden und ihren Spaltprodukten (Aminosäuren). Dabei bedurften gerade diese, in ihrem Verhalten nur allzu ähnlichen und darum schwer zu trennenden Stoffe am dringendsten einer Bereicherung der methodischen Möglichkeiten.

Als Chromatographie bezeichnet man heute allgemein ein Verfahren, bei dem eine Lösung zu trennender Stoffe eine feste Substanz in einer bestimmten Richtung durchströmt, wobei die einzelnen Komponenten, gleichgültig durch welchen Mechanismus (Adsorption, Ionenaustausch, Verteilung), selektiv verzögert werden. Als allgemeinste Formulierung kann nach Strain ²⁸⁾ die unterschiedliche Wanderung der zu trennenden Stoffe durch ein meist zweiphasiges System unter Ausbildung reversibler Gleichgewichte gelten.

Eine spezielle Art und zugleich die gebräuchlichste Form der Verteilungschromatographie ist die Papierchromatographie. Bei diesem Verfahren handelt es sich um eine fortdauernde Verteilung von Stoffen zwischen zwei nur begrenzt mischbaren flüssigen Phasen, einer stationären und einer beweglichen Phase, wodurch die Trennung der Stoffe stattfindet. Die stationäre Phase wird durch die wassergesättigte Papierfaser gebildet, d. h. als Träger der stationären (wässrigen) Phase fungiert die Cellulose als Form von besonders präpariertem Filterpapier; die bewegliche Phase wird durch das am Papier laufende wasserhaltige organische Lösungsmittel gebildet.

Jede papierchromatographisch analysierbare Substanz hat bei Verwendung eines ganz bestimmten Lösungsmittels eine ganz bestimmte Wanderungsgeschwindigkeit im Vergleich zu der des Lösungsmittels. Ein Mass für diese Wanderungsgeschwindigkeit ist der sogenannte R_F -Wert, welcher definiert ist als Quotient aus Weg der Substanz in der Zeit t (Entfernung des Substanzmittelpunktes vom Start, x_1) durch Weg des Lösungsmittels in der gleichen Zeit t (Entfernung der Lösungsmittelfront vom Start, x_2):

$$R_F = \frac{x_1}{x_2} \quad (0 < R_F < 1)$$

Der R_F -Wert ist die wichtigste Messgrösse in der Papierchromatographie und hängt von verschiedenen Variablen ab, wie Temperatur, Zusammensetzung der beiden Phasen, Beschaffenheit des Papiers, usw. Trennungen erfolgen am besten, wenn das R_F keinen extremen Wert aufweist und wenn die R_F -Werte der zu trennenden Substanzen möglichst

unterschiedlich sind.

Da die Wanderung der Substanzen auf dem Papier auf einer kontinuierlichen Verteilung zwischen der stationären Wasserphase und der beweglichen organischen Phase beruht, wird ein Stoff mit lipophilen Eigenschaften schneller wandern als einer mit hydrophile~~m~~ Charakter, so dass der R_F -Wert einer Substanz und ihre chemische Konstitution in einem gewissen Zusammenhang stehen. Die einzelnen Komponenten des chromatographisch zu trennenden Gemisches dürfen offensichtlich weder extrem hydrophilen noch extrem lipophilen Charakter haben, denn nur Substanzen, die zwischen diesen beiden Fällen liegende, intermediäre Eigenschaften haben, werden in beiden Phasen mehr oder minder löslich und somit chromatographisch trennbar sein. Diese Bedingung ist bei den von uns untersuchten Aminosäuren und Peptiden gegeben.

Die theoretische Behandlung der Verteilungschromatographie wurde zuerst von Martin und Synge ²⁹⁾ ausgeführt. Diese stellten eine Beziehung auf, nach der der R_F -Wert von dem Verteilungskoeffizienten α des gelösten Stoffes zwischen der stationären und der beweglichen Phase und den Volumina dieser Phasen im Chromatogramm abhängt. Diese Beziehung lautet:

$$R_F = \frac{V_b}{V_b + V_s \alpha} \quad (1)$$

V_b = Volumen der Lösungsmittelphase (bew.Phase)
im Chromatogramm

V_s = Volumen der wässrigen Phase (station.Phase)
im Chromatogramm

$\alpha = \frac{\text{Konz. des gelösten Stoffes in wässr. Phase}}{\text{Konz. des gelösten Stoffes in Lsm-Phase}}$

Diese Gleichung, die auf Grund vereinfachter Annahmen abgeleitet wurde, steht in guter Übereinstimmung mit den empirisch erhaltenen R_F -Werten einer ziemlich grossen Reihe von Aminosäuren und Peptiden.

Gleichung (1) kann auch folgendermassen geschrieben werden:

$$R_F = \frac{1}{1 + \frac{V_s}{V_b} \alpha}$$

Da für jedes Paar Papiersorte/Lösungsmittel der Faktor V_s/V_b eine charakteristische Konstante ist, wird der R_F -Wert nur von dem Verteilungskoeffizienten α abhängen. Ist α konstant, d. h. ändert es sich mit der Konzentration nicht, so ist der R_F -Wert ebenfalls konzentrationsunabhängig; die Wanderungsgeschwindigkeit ist dann konstant, so dass die Zone bei der Wanderung auf dem Papier ihre ursprüngliche Gestalt nicht ändert (ideale Chromatographie). Dieser Fall der idealen Chromatographie ist dann realisiert, wenn eine sofortige Gleichgewichtseinstellung zwischen den beiden Phasen und kein Diffusionsprozess eintritt.

Ist eine oder beide dieser Bedingungen nicht erfüllt, so ist α nicht mehr konzentrationsunabhängig, so dass die Wanderungsgeschwindigkeit eines Stoffes auf dem Papier nicht konstant ist. Die Zone behält nunmehr ihre anfängliche Form nicht bei; die Bandenvorderseite ist dann schärfer als die Rückseite, die Ränder sind verwaschen und es bilden sich asymmetrische Schlangenlinien, welche grösser werden, je weiter sie von der Startlinie ent-

fernt sind (nichtideale Chromatographie). Dies ist der praktisch häufigste Fall, denn die realen Systeme genügen selten gleichzeitig den oben erwähnten Voraussetzungen. Jedoch bleiben in vielen Fällen die R_F -Werte konstant, wenn man ihre Messung auf die Weise vornimmt, dass man die Strecke vom Start bis zum Zonenschwerpunkt abmisst.

b) Arbeitsmethodik ³⁰⁾

Für die Durchführung der Papierchromatographie lässt man Filterpapierbögen mit Lösungsmittel ansaugen und dieses sich entgegen der Erdanziehung aufwärts oder in ihrem Sinne abwärts bewegen. Das erstere Verfahren ("aufsteigende Chromatographie") führt zu etwas längeren Laufzeiten, das letztere ("absteigende Chromatographie") scheint besser reproduzierbare Resultate zu ergeben; es erlaubt vor allem, das Lösungsmittel die mehrfache Länge des Papiers durchströmen zu lassen, was bei Substanzen mit kleinen R_F -Werten vorteilhaft ist.

Die Methode der aufsteigenden Chromatographie kann nur dann verwendet werden, wenn die zu trennenden Substanzen grössere Unterschiede in ihren R_F -Werten aufweisen, da ab ca. 30 cm Papierhöhe kaum noch eine Lösungsmittelwanderung stattfindet. Da die R_F -Werte der Aminosäuren und Peptide unserer Hydrolysate zum Teil sehr wenig verschieden sind, musste für ihre Trennung das absteigende Verfahren gewählt werden.

Wir verwendeten als Papier die Sorte 2043 bm ausgew.

von Schleicher und Schüll, die aus reiner Baumwollfaser hergestellt ist und mittlere Eigenschaften besitzt. Um die Reinheit dieses Papiers zu prüfen, wurden Streifen mit bidestilliertem Wasser eluiert und das aufgefangene Eluat eingedampft, wobei im Gegensatz zu den handelsüblichen Filterpapieren kein Rückstand zurückblieb; immerhin enthalten auch diese gewaschenen Papiersorten Spuren von ninhydrinpositiven Substanzen.

Als Lösungsmittel benutzten wir ein Gemisch von 188 ml sekundärem Butanol, 33 ml Ameisensäure und 29 ml bidestilliertem Wasser (Lösungsmittel H); dieses von Wieland empfohlene Gemisch hat den Vorteil, ziemlich temperaturunempfindlich zu sein und zu guter Trennung der Hydrolysatkomponenten zu führen.

Damit man zu guten und reproduzierbaren Chromatogrammen gelangt, ist es erforderlich, in luftdichten Behältern zu arbeiten, denn nur auf diese Weise wird eine Sättigung der Behälteratmosphäre erreicht, was für eine gleichmässige Wanderung der beweglichen Phase unerlässlich ist. Wir benutzten deshalb Steingutkästen, die über einen Gummistreifen mit einer Glasplatte abgedichtet waren. In den Kästen befanden sich Steinguttröge, welche mit dem Lösungsmittel gefüllt wurden. Um das gleichmässige Abtropfen des Lösungsmittels zu gewährleisten, wurde der untere Rand der Papierbögen in Zackenform abgeschnitten.

Das Auftragen der Substanz auf dem Papier geschah am vorteilhaftesten, indem man etwa 10^{-5} Mol des gefrier-

getrockneten Peptidhydrolysats, in 0,2 ml bidest. Wasser gelöst, mittels einer abgerundeten Kapillarpipette vorsichtig, ohne das Papier zu verletzen, auf eine mit Bleistift markierte Startlinie auszog. Die Startlinie hatte eine Länge von 20 cm und eine Breite von ca. 1 cm und befand sich in einem Abstand von 13 cm vom oberen Rand des 56 x 56 cm² grossen Papierbogens. Es wurde dreimal mit 2 Tropfen Wasser nachgespült. Gleich darauf wurde das Wasser mit einem Föhn verdampft.

Nach Auftragen der Substanz wurden die unten ausgezackten Papierbögen mit dem oberen Rand in die Tröge eingehängt, diese mit dem Lösungsmittel H gefüllt und dann der Kasten mit der Glasplatte abgeschlossen. Nach 24-48 Stunden Laufzeit, je nach Hydrolysat und Raumtemperatur, erreichte man eine brauchbare Trennung der Gemischkomponenten. Eine Laufzeit von 30 Stunden erwies sich als sehr günstig, denn mit längeren Laufzeiten wurde die Trennung der einzelnen Bestandteile nicht besser, dagegen aber die Zonen im Chromatogramm breiter, was für die danach folgende Elution nachteilig war.

Nach vollzogener Trennung wurden die feuchten Bögen mit der Startlinie nach unten (um zu vermeiden, dass das Lösungsmittel über das Papier lief, was zu einer Verwaschung des Chromatogramms geführt hätte) in einem Trockenschrank aufgehängt und bei 40°C mit Luftstrom getrocknet. Durch diese schonende Trocknung wurden Verluste, die durch oxydative Zersetzung der Aminosäuren bei zu heissem Trocknen möglicherweise eintreten könnten ³¹⁾, verhindert.

Nach der Trocknung musste die Position der Substanzen auf den Papieren festgestellt werden. Das allgemein übliche Besprühen des ganzen Papiers mit Ninhydrinlösung durfte nicht angewandt werden, da dabei gerade der radioaktive Carboxylkohlenstoff als CO_2 frei wird und dadurch eine spätere quantitative Bestimmung der Substanzen unmöglich macht. Eine genaue Ermittlung der Zonen auf Grund der an den Rändern mitgelaufenen und später mit Ninhydrin angefärbten, im Hydrolysat zu erwartenden Reinsubstanzen war nicht möglich, weil die Wanderungsgeschwindigkeit der Substanzen an den Rändern und in der Mitte des Papiers etwas verschieden ist, denn die im zentralen Bereich des Papiers laufenden Spaltprodukte bremsen sich gegenseitig in ihrer Wanderung, so dass eine am Rand laufende Substanz eine grössere Strecke zurücklegt, als die gleiche aus dem Hydrolysat stammende Substanz.

Wir verfahren deshalb so, dass wir zwei dünne Striche butanolischer 0,2iger Ninhydrinlösung in Laufrichtung über die Papiere zogen und anschliessend die Chromatogramme 20 Minuten auf $110-115^{\circ}\text{C}$ erhitzen. Die Aminosäure bzw. Peptid enthaltenden Papierzonen zeigten dann eine violette Färbung, wodurch ihre ungefähre Lage festgestellt wurde. Gleich darauf wurde die genaue Form der Zonen sichtbar gemacht, indem wir das Papier unter der UV-Lampe untersuchten, denn Aminosäuren und Peptide zeigen nach vorherigem Erhitzen auf dem Cellulosepapier eine Fluoreszenz in ultravioletterem Licht. Die so betrachteten Papiere wiesen in den Bereichen mit Substanz ein leicht sichtbares helles Violett in einer dunkelvioletten Umgebung auf.

Die Intensität der Fluoreszenz wächst mit der Temperatur und hängt stark von der Reinheit des Papiers ab. Es darf also auch deshalb nur gewaschenes Papier verwendet werden, da Verunreinigungen ebenfalls zu fluoreszieren vermögen.

Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei 3 γ Aminosäure bzw. Peptid pro cm^2 Papier, sie ist also nicht so empfindlich wie der Nachweis mit Ninhydrin, der bei 1 γ/cm^2 liegt. Falls eine der Substanzen des Hydrolysatgemisches im Papier in kleinerer Menge als 3 γ/cm^2 vorhanden war, konnte aus diesem Grund nur mit Ninhydrinlösungstrichen oder anhand der am Rand mitgelaufenen Testsubstanz ihre Lage festgestellt werden. Eine andere Möglichkeit, von der wir auch gelegentlich Gebrauch machten, war, ihre Menge auf die Art zu erhöhen, dass das Nachwaschen des Hydrolysats beim Auftragen auf die Startlinie nicht wie üblich mit Wasser, sondern mit verdünnter wässriger Lösung der in Frage kommenden Substanz erfolgte.

Unter Zuhilfenahme einer oder aller dieser drei erwähnten Möglichkeiten (Ninhydrin, UV-Licht, mitlaufende Vergleichssubstanzen) waren die Substanzflecken immer deutlich zu erkennen und somit exakt auszuschneiden. Soweit es möglich war, wurde jedoch stets die Ermittlung der Zonenlage allein auf Grund der Fluoreszenz unter der UV-Lampe vorgenommen, denn so wurden Substanzverluste, die das Linienziehen mit Ninhydrin - wenn auch in kleinster Menge - mit sich bringt, vermieden.

Nach Festlegung der Lage wurden die Zonen ausgeschnitten und mit bidest. Wasser eluiert, was nach dem Prinzip der

absteigenden Chromatographie in geschlossenen Glaskästen erfolgte. Die Elution dauerte, je nach Raumtemperatur und Wasserdampfsättigung der Kastenatmosphäre, 5 bis 9 Stunden. Das Eluat (etwa 1,5 ml) wurde direkt in den für den Zähler verwendeten Schälchen gesammelt und das Wasser mit einer Infrarotlampe verdampft. Die auf dem Schälchenboden verbliebene dünne Schicht aktiver Substanzen konnte nun zur Auszählung kommen.

c) Genauigkeit der chromatographischen Trennung

Um festzustellen, wie gross die Verluste an radioaktiver Substanz bei der chromatographischen Arbeit waren, wurde die Aktivität bestimmter Mengen markierter Aminosäuren und Peptide vor und nach der Papierchromatographie ermittelt und verglichen.

Dafür bestimmten wir direkt im Meßschälchen die Aktivität einer gegebenen Menge radioaktiver Substanz. Dann wurde diese in dem Meßschälchen mit bidestilliertem Wasser gelöst, die Lösung auf das Papier aufgetragen und der Chromatographie ausgesetzt. Nach beendeter Chromatographie wurde die Substanz aus dem Papier eluiert, in dem gleichen Schälchen aufgefangen, getrocknet und ihre Aktivität wieder gemessen.

Es ergab sich, dass die Verminderung der Zählrate der radioaktiven Substanzen im Mittel 4 % betrug, wie Tabelle 1 zeigt:

Tabelle 1

Mol Substanz	Vor d.Chrom. ipm	Nach d.Chrom. ipm	Verluste %
$6,1 \cdot 10^{-6}$ M Glycin	7115 (± 200)	6950	2,3
$2,0 \cdot 10^{-6}$ M Glycin	2450 (± 100)	2325	5,1
$6,1 \cdot 10^{-7}$ M Glycin	725 (± 35)	705	3,4
$2,0 \cdot 10^{-7}$ M Glycin	243 (± 15)	241	0,9
$6,0 \cdot 10^{-6}$ M Ala-Ser	8560 (± 200)	8200	4,2
$3,0 \cdot 10^{-6}$ M Ala-Ser	4320 (± 100)	4155	3,8
$6,0 \cdot 10^{-7}$ M Ala-Ser	850 (± 35)	835	1,6
$3,0 \cdot 10^{-7}$ M Ala-Ser	435 (± 15)	422	3,0

Die Abnahme der Aktivität beruht nicht nur auf einem kleinen unvermeidlichen Substanzverlust während des Arbeitsganges, sondern auch auf der Wirkung von Verunreinigungen im Papier und im Lösungsmittel, die bei der Elution zusammen mit der Substanz aus dem Papier herausgewaschen werden. Es ist nicht damit zu rechnen, dass diese Aktivitätsabnahme durch Verfeinerung der Arbeitsweise völlig auszuschalten ist.

d) Chromatogramme

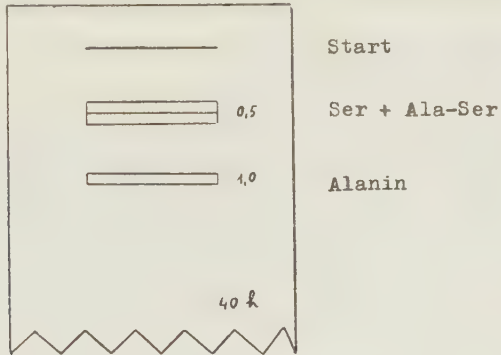
Obwohl der R_F -Wert genau wie der Schmelzpunkt, die Dichte, der Brechungsindex usw. eine charakteristische physikalische Konstante darstellt, sind die in der Literatur angegebenen R_F -Werte nur dann gültig, wenn alle Versuchsbedingungen, vor allem aber Papiersorte und Lösungsmittel, angegeben sind.

Wertvoller jedoch als die Aufführung der R_F -Werte in der

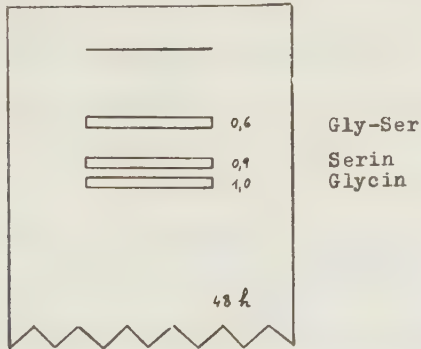
Literatur, besonders im Falle chemisch gleichförmiger Substanzen wie Aminosäuren und Peptide, ist es, sogen. Leitchromatogramme anzufertigen. Dafür wird der Papierbogen in senkrechte Bereiche eingeteilt und neben dem zu identifizierenden Substanzgemisch reine, bekannte, im Gemisch zu erwartende Testsubstanzen mitlaufen gelassen. Da die einzelnen Substanzzonen sich in ihrer Lage etwas beeinflussen, ist es zweckmässig, daneben noch ein Testgemisch (eine Mischung der als Leitchromatogramme verwendeten Reinsubstanzen) laufen zu lassen.

Auf der folgenden Seite sind die eindimensionalen Chromatogramme der Spaltprodukte des Glycylserins, Alanylserins und Glycylalanylserins bei der neutralen Hydrolyse mit der relativen Fleckenreihenfolge abgebildet. Die angegebenen Zahlen sind nicht die laut Definition berechneten absoluten R_F -Werte, sondern die auf dem Chromatogramm gemessenen relativen R_F -Werte, wobei der Abstand der entferntesten Zone vom Start gleich 1 gesetzt wurde.

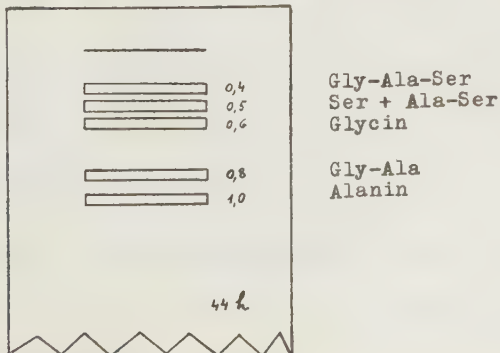
Chromatogramm der Spaltprodukte des Alanylserins



Chromatogramm der Spaltprodukte des Glycylserins



Chromatogramm der Spaltprodukte des Gly-Ala-Ser



2. Elektrophorese

a) Allgemeine Grundlagen

Eine weitere Trennungsmethode, die, wie die Papierchromatographie, mit ganz geringen Substanzmengen zu arbeiten gestattet und, wie diese, für die Trennung chemisch gleichartiger Stoffe mit Erfolg angewandt werden kann, ist die Elektrophorese. Dieses Verfahren, das meist in der Eiweisschemie benutzt wird, beruht auf der unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit der geladenen Bestandteile eines Stoffgemisches im elektrischen Feld. Auf Grund dieses verschiedenen Wanderungsvermögens lassen sich Stoffgemische gut trennen, denn alle Stoffe, die eine Ladung besitzen, werden infolge dieser Ladung mit einer ganz bestimmten Geschwindigkeit im elektrischen Feld wandern.

Nach einem Vorschlag von Martin und Synge ³²⁾ bezeichnet man allgemein mit "Elektrophorese" den Transport grosser Ionen im elektrischen Feld; liegen kleinere Ionen vor, so spricht man von "Ionophorese".

Bei der klassischen Elektrophorese nach Tiselius (die sogenannte "freie" Elektrophorese) wird das zu untersuchende Gemisch in einem geeigneten Puffer gelöst, die Lösung in ein U-Rohr gebracht, mit demselben Puffer überschichtet und der Wirkung eines elektrischen Feldes ausgesetzt. Das Ergebnis dieser Methode entspricht der Frontanalyse bei der Chromatographie, d. h. es wird nur ein kleiner Prozentsatz der schnellsten und der langsamsten Komponenten getrennt, während die übrigen Fraktionen

einander überdecken. Eine vollständige Trennung ist niemals möglich, denn die Grenzflächen müssen durch die Schwerkraft stabilisiert werden, was eine notwendige Begrenzung der Trennungskapazität der Methode bedingt.

Aus diesem Grunde hat man versucht, in Weiterentwicklung der Tiseliuschen Elektrophorese die Banden statt durch die Schwerkraft durch Träger (Asbest, Kieselgel, Austauscherharze, usw.) zu stabilisieren. Erst die Verwendung von Filterpapieren als Träger führte zu vollem Erfolg, so dass das Filterpapier als nahezu idealer Träger bezeichnet werden kann ³³⁾.

Bei der Papierelektrophorese erfolgt die Wanderung der Ampholyten in mit Pufferlösungen getränkten Filterpapieren. Die Papierelektrophorese hat also formal viel Ähnlichkeit mit der Papierchromatographie; während aber bei letzterer der Stofftransport im Flüssigkeitsstrom erfolgt, werden die Substanzen im elektrophoretischen Versuch bei fast ruhender Flüssigkeit durch das elektrische Feld in Bewegung gesetzt.

Der Trennungsgrad zweier sich im Gemisch befindenden Verbindungen A und B hängt bei der Elektrophorese vor allem von dem Unterschied ihrer Beweglichkeiten u_A und u_B (Wanderungsgeschwindigkeit im Potentialgradient von 1 Volt/cm) ab. Beträgt das Spannungsgefälle V Volt/cm, so wird der Abstand zwischen den Substanzzonen nach einer Wanderungszeit t :

$$d_A - d_B = (u_A - u_B) V t$$

Im Falle von schwachen Elektrolyten, wie Aminosäuren und Peptiden, hängen die Beweglichkeiten der ionischen Molekülanteile (die sog. Nettobeweglichkeiten U) nicht nur von der Ionenbeweglichkeit u , sondern auch von dem Dissoziationsgrad α ab: $U_i = u_i \alpha_i$

Die ionischen Anteile eines schwachen Elektrolyts wandern im elektrischen Feld nicht in einzelnen Banden, sondern in einer gemeinsamen Zone, deren Wanderungsgeschwindigkeit (apparente Beweglichkeit v) ³⁴⁾ gleich ist der Summe der Nettobeweglichkeiten ihrer positiven ionischen Anteile p minus der Summe der Nettobeweglichkeiten der negativen Anteile n :

$$v = \sum_{i=1}^p U_i - \sum_{j=1}^n U_j = \sum_{i=1}^p u_i \alpha_i - \sum_{j=1}^n u_j \alpha_j$$

Bei unseren Versuchen wurden die Substanzen in einem Gemisch, dessen pH-Wert 3,2 betrug, elektrophoretisch behandelt. Bei diesem pH-Wert liegen die Aminosäuren und Peptide fast ausschliesslich als positive Ionen vor, so dass in obiger Gleichung der Anteil der Anionen vernachlässigbar ist. Für unseren Fall haben wir also für die apparente Beweglichkeit einfach:

$$v = U_1 = u_1 \alpha_1$$

wobei u_1 die Beweglichkeit des Kations $\text{H}_3\text{N}^+\text{-R-COOH}$ und α_1 sein Dissoziationsgrad gemäss der Dissoziationsgleichung



bedeuten.

Bei der Bestimmung der ungefähren Beweglichkeiten muss man den hindernden Einfluss des Trägers (Papier) sowie die Endosmose (Elektrosmose) in Rechnung stellen. Wegen dem Einfluss des Papiers müssen alle für die "freie" Elektrophorese errechneten Formeln mit einer Korrektur versehen werden; so muss z. B. die Formel $d = utE/l$, wobei d die Wanderungsstrecke, u die Beweglichkeit, t die Zeit, E die Feldstärke und l die Länge des Flüssigkeitskanals bedeuten, ersetzt werden durch die Formel $d = utE/l'$, wobei l' den vielfach gewundenen Flüssigkeitskanal im porösen Träger bedeutet (Abb. 1).

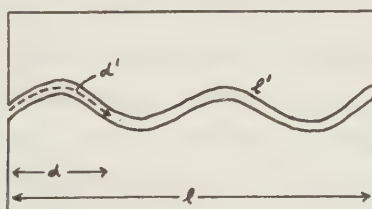


Abb.1 Weg eines wandernden Ionen in einem porösen Träger (Filterpapier).
Nach Kunkel und Tiselius.

Mit Hilfe des für eine bestimmte Papiersorte gefundenen Quotienten l/l' können die Beweglichkeiten im Papier-elektropherogramm annähernd berechnet werden.

Auch muss man bei der Bestimmung der Beweglichkeiten die Endosmose berücksichtigen, denn diese bewirkt im allgemeinen einen katodisch gerichteten Flüssigkeitsstrom, der dem Spannungsgefälle proportional ist. Daher muss man zur Bestimmung der Beweglichkeit einen Korrekturfaktor für Anionen addieren und für Kationen subtrahieren.

Man erhält den Wert dieser Korrektur, indem man die Wanderungsstrecke eines ungeladenen Stoffes, wie Dextran, unter gleichen Bedingungen bestimmt.

Neben der Differenz der Beweglichkeiten spielt auch in der Papierelektrophorese die Dispersion der Zonen während der Wanderung eine wichtige Rolle. Man kann daher einen experimentell zu ermittelnden Pseudodiffusionskoeffizienten einführen, der von der angewandten Technik und von der Art der untersuchten Stoffe abhängt, und welcher u. a. die eigentliche Diffusion und die Temperaturgradienten einschliessen soll.

Die Diffusion bewirkt eine Verbreiterung der Zonen. Je grösser die Laufzeiten sind, desto höher ist die Diffusion und somit die durch sie hervorgerufene Verbreiterung der Zonen. Will man scharfe, schmale Zonen erhalten, so muss man entsprechend den Diffusionseffekt verringern, indem man die Zeit verkürzt, die man zum Zurücklegen der für eine gute Trennung erforderlichen Strecke braucht. Dies gelingt beim Arbeiten mit hohem Spannungsgefälle; hier sind die Versuchszeiten kürzer und damit die Diffusion geringer, was für niedermolekulare Substanzen (Aminosäuren, Peptide), die rasch diffundieren, ein bedeutender Vorteil ist, der in schmalen Zonen zum Ausdruck kommt. In solchen Fällen ist die Hochspannungselektrophorese die zu wählende Methode.

b) Arbeitsmethodik

Eine der ersten Apparaturen zur Trägerelektrophorese wurde schon 1939 von Coolidge³⁵⁾ entwickelt, mit Hilfe derer eine Trennung der Serumproteine in Albumine und Globuline gelang. Coolidge verwendete als stabilisierenden Träger gemahlene Glaswolle.

Einige Jahre später konnten Butler und Stephen³⁶⁾ in einer ähnlichen Apparatur mit Asbest als Träger die Trennung von Glycin und Glycylglycin durchführen. Th. Wieland und E. Fischer³⁷⁾ zeigten 1948 unabhängig von amerikanischen Untersuchern (Durrum³⁸⁾), dass eine elektrophoretische Trennung von Aminosäuren und Peptiden auf Filterpapierstreifen durchzuführen ist. Turba und Enenkel³⁹⁾ wandten als erste mit Erfolg die Wielandsche Apparatur zur Trennung von Proteinen an.

Schliesslich erreichte Michl⁴⁰⁾ im Jahre 1951 durch Erhöhung des Spannungsgefälles auf etwa 50 Volt/cm (Hochspannungs-Elektrophorese) eine Abkürzung der Versuchszeiten und dadurch eine weitgehende Ausschaltung der Diffusion, ein Vorteil, der im Scharfbleiben der Zonen zum Ausdruck kommt.

Für unsere Untersuchungen stand der Hochspannungssphero-graph nach Wieland und Pfeleiderer (Pherograph Original Frankfurt, geliefert von der Firma Hormuth & Vetter, Heidelberg) zur Verfügung. Dieses Gerät hat eine Kühlvorrichtung zum Verhindern eines Austrocknens oder Verbrennens der Papierbögen, denn wegen der hohen Feldstärken werden grosse Wärmemengen entwickelt. Der Pherograph

besteht aus einer Kühlkammer und zwei Elektrodenkammern, alle aus Kunststoff. Die Kühlkammer ist mit einem Gemisch Methanol + Wasser gefüllt, welches als Wärmeüberträger dient. Auf diese Kammer ist eine Glasplatte dicht aufgekittet, auf die der mit Pufferlösung getränkte Papierbogen gelegt wird. Die Elektrodenkammern enthalten die Pufferlösung und je einen Leinenstreifen, welcher die leitende Verbindung zwischen den Platinelektroden und dem Papier bildet.

Wir verwendeten als Puffer die von Michl ⁴⁰⁾ empfohlenen Gemische Pyridin : Essigsäure : Wasser, die sich leicht nach beendeter Elektrophorese durch Erwärmen aus dem Papier entfernen lassen, was einen grossen Vorteil für mikropräparative Arbeiten (wie in unserem Fall die Aktivitätsbestimmung sehr kleiner Substanzmengen) bedeutet. Ausserdem haben diese Gemische eine geringe Leitfähigkeit, so dass sie die Anwendung hoher Spannungen gestatten. Vorversuche mit solchen Gemischen mit verschiedenem pH-Wert zeigten, dass eine Trennung nur beim pH 3-4 möglich ist. Es wurde ein Puffergemisch von 7 ml Pyridin, 100 ml Eisessig und 893 ml Wasser gewählt, das einen pH-Wert von 3,2 hat. Dieses Gemisch besitzt geringe elektrische Leitfähigkeit und noch ausreichende Pufferkapazität; Gemische mit grösserem Pyridingehalt weisen höhere Leitfähigkeit auf, was unerwünscht ist.

Da für die Elektrophorese mit hohen Spannungen sich ein nicht zu dünnes Papier mit geringem Widerstand und erhöhtem Stromdurchgang empfiehlt, benutzten wir die

Sorte MN 2214 von Macherey und Nagel, Düren, welche die erwähnten Eigenschaften besitzt. Der Verunreinigungsgrad dieses dickeren Papiers ist auch nicht grösser als der dünneren Papiere.

Die $35 \times 40 \text{ cm}^2$ grossen Papierbögen wurden mit der Pufferlösung getränkt, ausgepresst und dicht auf die Glasplatte der Kühlkammer gewalzt. Dann wurde die Substanz (etwa 10^{-5} Mol in 2-3 Tropfen Wasser gelöst) mit einer Kapillarpipette vorsichtig auf einer mit Bleistift markierten 20 cm langen Linie auf das Papier aufgetragen, zweimal mit Wasser nachgespült, die Leinenstreifen auf die Papierenden gelegt, das Papier mit einer Glasplatte bedeckt und danach der Strom eingeschaltet.

Die Temperatur und die Stromstärke mussten gut aufeinander abgestimmt werden, um ein Verdampfen des Puffers aus dem Papier oder gar ein Verbrennen des Papiers zu verhindern. Die besten Bedingungen lagen bei einer Feldstärke von $50-60 \text{ Volt/cm}$ und einer Temperatur in der Kühlkammer von 0 bis -4°C , wobei sich eine Stromstärke von $60-80$ Milliampère einstellte. Die Trennung dauerte je nach Hydrolysat 1 bis 2 Stunden.

Die Weiterverarbeitung der Pherogramme nach beendeter Elektrophorese war die gleiche wie die der Chromatogramme.

Die Untersuchungen über die Verluste an radioaktiver Substanz bei der elektrophoretischen Trennung ergaben, dass die Verminderung der Zählrate der radioaktiven Sub-

stanzen von derselben Größenordnung waren wie die der chromatographischen Arbeiten, also 4%, wie aus Tabelle 2 hervorgeht.

Tabelle 2

Mol Substanz	Vor d.Elekt. ipm	Nach d.Elekt. ipm	Verluste %
$7,0 \cdot 10^{-6}$ M Alanin	9620 (± 200)	9135	5,0
$5,3 \cdot 10^{-6}$ M Alanin	7745 (± 150)	7490	3,3
$7,0 \cdot 10^{-7}$ M Alanin	960 (± 40)	940	3,2
$5,3 \cdot 10^{-7}$ M Alanin	770 (± 30)	740	3,9
$6,2 \cdot 10^{-6}$ M Ala-Ser	9115 (± 200)	8640	5,2
$4,5 \cdot 10^{-6}$ M Ala-Ser	6880 (± 150)	6565	4,6
$6,2 \cdot 10^{-7}$ M Ala-Ser	910 (± 40)	885	2,8
$4,5 \cdot 10^{-7}$ M Ala-Ser	685 (± 25)	675	1,7

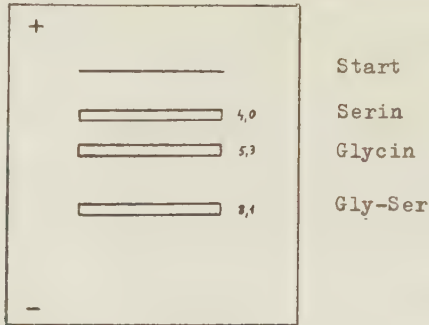
Wie bei der Chromatographie beruht die Aktivitätsabnahme nicht nur auf einem kleinen Substanzverlust während des Arbeitsganges, sondern auch auf der Wirkung von Verunreinigungen im Papier und Puffer, die bei der Elution aus dem Papier herausgewaschen werden.

c) Pherogramme

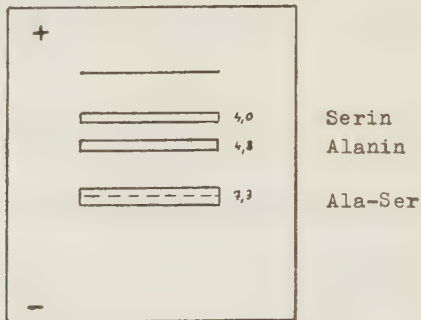
Auf der folgenden Seite sind die eindimensionalen Pherogramme der Spaltprodukte des Glycylserins, Alanylserins und Glycylalanylserins bei der neutralen Hydrolyse abgebildet. Die angegebenen Zahlen sind die Mittelwerte der relativen apparenten Beweglichkeiten v , d. h. die Abstände in cm zwischen den Zonenmittelpunkten und dem Start. Die v -Werte im Tripeptid sind kleiner als die entsprechenden in den Dipeptiden, weil die Ionenwanderung im elektrischen Feld stärker durch die grössere Zahl der anwesenden Ionen gehindert wird. Eine analoge Erscheinung tritt auch in der Chromatographie auf.

Zwischen der Struktur einer Verbindung und ihrer Beweglichkeit besteht ein Zusammenhang in dem Sinne, dass je höher der pK-Wert ihrer Carboxylgruppe, desto grösser ihre apparente Beweglichkeit. Deshalb ist die Tatsache, dass das Alanylserin sich bei der Elektrophorese in seine beiden Stereoisomeren aufspaltet, auf die Verschiedenheit ihrer pK-Werte zurückzuführen ²⁴⁾.

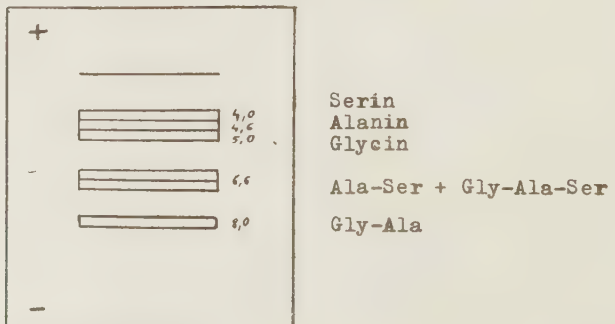
Pherogramm der Spaltprodukte des Glycylserins



Pherogramm der Spaltprodukte des Alanylserins



Pherogramm der Spaltprodukte des Gly-Ala-Ser



V. A k t i v i t ä t s b e s t i m m u n g 41,42)

1. Geräte und Messbedingungen

Zur quantitativen Bestimmung der chromatographisch bzw. elektrophoretisch getrennten Spaltprodukte wurde die Aktivität der C-14 markierten Substanzen gemessen.

C-14 ist ein β -Strahler niedriger Energie (seine maximale Energie beträgt 0,158 MeV), so dass sein Durchdringungsvermögen in Materie sehr klein ist. Da also die Reichweite dieser energiewachen β -Strahlung sehr gering ist, muss man bei ihrem Nachweis eine Absorption möglichst vermeiden. Wird die Messung mit einem Fensterzählrohr ausgeführt, so treten bereits starke Verluste durch die Absorption im Zählrohrfenster und in der Luftschicht zwischen Präparat und Fenster auf. Deshalb verwendet man am besten fensterlose Zählrohre, also solche, bei denen das zu messende Präparat direkt in den Zählraum eingebracht wird. Damit fällt die genannte Absorption weg und ausserdem wird der wirksame Raumwinkel vergrössert und dadurch der Geometriefaktor günstiger. Aus beiden Gründen wird die Ausbeute des Zählrohres gesteigert, was dann wichtig ist, wenn man, wie in unserem Falle, zum Teil sehr geringe Aktivitäten von 100 - 200 ipm messen muss.

Ein für unsere Messungen geeignetes Gerät, das die erwähnten Eigenschaften besitzt, ist der Methandurchflusszähler FH 51 mit dem 2 π -Zählrohr FH 512 im Anschluss an das Impulszählgerät FH 90.

Der Methandurchflusszähler ist ein Proportionalitätszähler, d. h. die gezählten Impulse sind der Energie der eingestrahlten Teilchen proportional. Als Zählgas wird Methan verwendet. Die Zähleigenschaften werden konstant gehalten, da das Gas im Zählraum kontinuierlich erneuert wird. Das 2π -Zählrohr wird im Proportionalbereich betrieben, in welchem die Höhe der gelieferten Impulse proportional der Primärionisation ist. In dem Proportionalbereich ist die Impulsrate nahezu von der Spannung im Zählrohr unabhängig.

Ein grosser Vorteil dieses Gerätes ist, dass man einfach durch Änderung der Zählrohrspannung die Alpha- und Beta-Komponente eines gemischten Strahlers oder eines Strahlergemisches voneinander trennen und erfassen kann. Ein weiterer Vorteil des Proportionalbereiches ist, dass in ihm die Zähleigenschaften unempfindlicher gegen Änderung des Druckes oder der Zusammensetzung des Gases ist; ausserdem ist das Auflösungsvermögen besser, so dass sowohl sehr schwache als auch sehr starke Aktivitäten gemessen werden können.

Da der Methandurchflusszähler im Proportionalbereich bei Atmosphärendruck arbeitet, sind relativ hohe Zählspannungen notwendig; da diese hohen Spannungen ausserdem sehr konstant sein müssen, besteht das Gerät aus einem elektronisch stabilisierten Netzteil, einer geregelten Hochspannungseinheit und einem Vorverstärker mit Diskriminator.

Die von dem Methandurchflusszähler erzeugten elektri-

schen Impulse werden in dem angeschlossenen Strahlungsmessgerät verstärkt, geformt und zur Anzeige an das elektronische Zählwerk gegeben; die Impulse werden durch einen gelenkten Kathodenstrahl an der Röhrenwandung angezeigt und somit gezählt.

Die Eigenschaften des Zählrohres werden durch seine Charakteristik und seine Geometrieabhängigkeit gegeben. Aus der aufgenommenen Charakteristik (Abb. 2) ergab sich ein Plateau von 500 Volt und eine Steigung von 0,8 %. Es wird gemessen ungefähr 150 Volt oberhalb des Plateaubeginns, also bei 3550 Volt (Arbeitsspannung). Der Null-effekt des Gerätes liegt bei 15 ± 3 Imp/min. Die Messbedingungen müssen in einer Messreihe immer gleich sein, da dies die Voraussetzung für eine sinnvolle Vergleichsmessung ist. Deshalb müssen bei allen Messungen sämtliche Faktoren und Effekte, wie die Selbst- und Rückstreuung, der Geometriefaktor und die Selbstabsorption, konstant gehalten werden.

Die "Selbststreuung", die eine Änderung der Impulsrate verursacht, weil die β -Teilchen die Absorberatome anregen oder ionisieren, kann bei unserer Messanordnung vernachlässigt werden. Wichtiger ist die "Rückstreuung", die hauptsächlich durch die elektrostatischen Kräfte zwischen den β -Teilchen und den Atomkernen des Schälchens hervorgerufen wird und von dem Schälchenmaterial und dessen Dicke abhängt. Da wir aber immer nur Schälchen aus gleichem Material (Aluminiumschälchen) benutzen und stets unter gleichen Bedingungen messen, brauchen wir die Rückstreuung nicht zu berücksichtigen.

Wie aus der nachstehenden Tabelle 3 hervorgeht, ist die Änderung der Impulsrate eines gleichen Präparats, wenn es einmal auf V2A-Schälchen und dann auf Aluminiumschälchen gemessen wird, sehr klein. Der Effekt der Rückstreuung wird also unter den gegebenen Messbedingungen verdeckt.

Tabelle 3

Präparat	V2A-Schälchen	Al-Schälchen
$6,0 \cdot 10^{-6}$ M Alanin	8580	8535
$3,0 \cdot 10^{-6}$ M Alanin	4315	4300
$1,5 \cdot 10^{-6}$ M Alanin	2155	2190
$6,0 \cdot 10^{-6}$ M Ala-Ser	8980	9035
$3,0 \cdot 10^{-6}$ M Ala-Ser	4450	4410
$1,5 \cdot 10^{-6}$ M Ala-Ser	2315	2345

Die Geometrieabhängigkeit des Zählrohres, d. h. die Abhängigkeit der Impulsrate von der Lage der Substanz auf dem Schälchen, ist relativ klein. Aus Abbildung 3 sieht man, dass die Abweichung der Impulsrate äusserst gering ist, wenn sich das Präparat innerhalb eines Kreises von Radius 6 mm um den Schälchenmittelpunkt befindet; dagegen sinkt die Impulsrate infolge des verminderten Raumwinkels um ca. 12 %, wenn sich die Substanz einmal im Schälchenzentrum und dann am Rand befindet. Diese starke Verminderung der Impulsrate wird dann von Bedeutung, wenn das Präparat wegen schlechter Benetzung sich beim Trocknen mit der IR-Lampe zum Schälchenrand hin konzentriert. Um dies möglichst zu verhindern, versetzen wir das im Schälchen aufgefangene Eluat vor dem

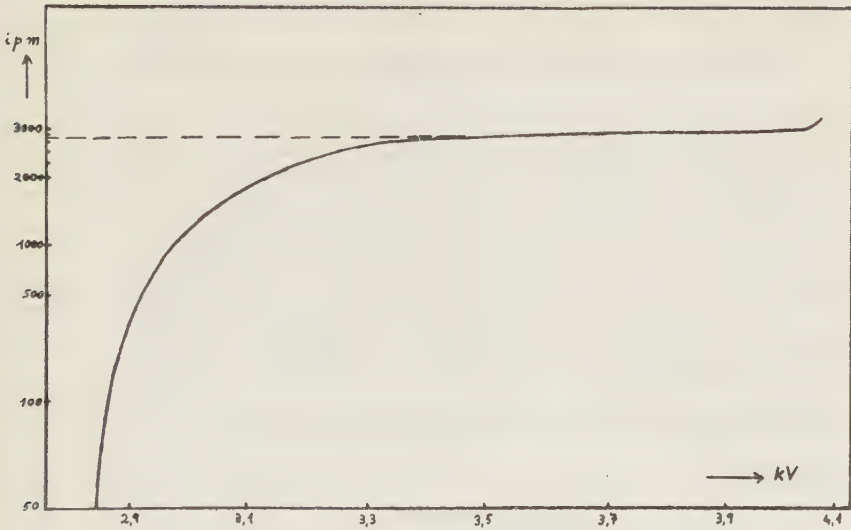


Abb. 2 Zählrohrcharakteristik FH 51

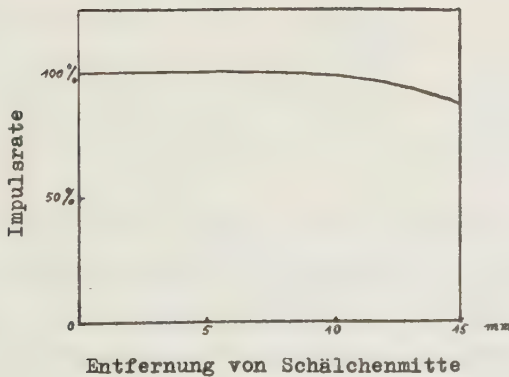


Abb. 3 Abhängigkeit der Impulsrate von der Präparatlage ($d = 30 \text{ mm}$) 43)

Eindampfen mit einem Tropfen Netzmittel (stark verdünntes Pril). Dadurch blieb nach dem Eintrocknen der grösste Teil der Substanz im zentralen Optimalbereich des Schälchens, während sich am Rand nahezu keine Substanz befand.

Die Zählrate hängt nicht nur von der Präparatlage ab, sondern auch von der Orientierung des Schälchens im Probenwechsler, denn die Verteilung der Substanz auf dem Schälchen ist nicht axialsymmetrisch. Deshalb muss man die Messung bei verschiedenen Positionen des Schälchens ausführen; man findet im allgemeinen bei Drehung des Schälchens einen anderen Wert der Impulsrate (Tabelle 4).

Tabelle 4

Zählrate bei verschiedenen Orientierungen
der Schälchen in dem Probenwechsler

Präparat: $5,2 \cdot 10^{-6}$ M Alanin		Präparat: $4,3 \cdot 10^{-6}$ M Ala-Ser	
Orientierung	ipm	Orientierung	ipm
1	7635	1	6580
2 nach Dreh.um 90°	7720	2 nach Dreh.um 90°	6235
3 nach Dreh.um 180°	7345	3 nach Dreh.um 180°	6475
4 nach Dreh.um 270°	7590	4 nach Dreh.um 270°	6545

Die Selbstabsorption, d. h. die Absorption im Präparat, steigt mit dessen Dicke. Wenn das Präparat so dick ist, dass die unteren Schichten tiefer liegen als die Reichweite der ausgesandten Strahlung, dann nähert sich die Selbstabsorption einem Sättigungswert. Es gibt einige Möglichkeiten, um die Selbstabsorption zu berücksichti-

gen. Man kann z.B. oberhalb der Sättigungsdicke arbeiten, so dass dann die Aktivität proportional der spezifischen Aktivität der Substanz ist. Eine andere Arbeitsweise besteht darin, dass man eine Selbstabsorptionskurve aufnimmt, anhand derer die Aktivität ohne Selbstabsorption berechnet werden kann. Man kann auch, um die Selbstabsorption konstant zu halten, immer mit gleicher Schichtdicke arbeiten; dies ist aber präparativ sehr schwierig. Die beste Methode jedoch ist es, mit solcher dünnen Schichtdicke zu arbeiten, bei der die Selbstabsorption so klein ist, dass sie keine Rolle mehr spielt.

Diese Arbeitsweise haben wir stets bei unseren Messungen vorgenommen, denn bei den anderen oben erwähnten Methoden ist die Kenntnis der genauen Menge des Präparats erforderlich. Die Schichtdicke, bei der die Selbstabsorption vernachlässigbar ist, wird in der Literatur mit bis etwa $0,5 \text{ mg/cm}^2$ angegeben. Da die maximal anfallende Peptidmenge pro Schälchen ungefähr 1 mg ist und die Schälchenfläche $7,07 \text{ cm}^2$ beträgt, wird die Substanzmenge pro cm^2 bei gleichmässiger Verteilung auf dem Schälchen höchstens also $0,14 \text{ mg/cm}^2$ sein. Bei den in unseren Versuchen angewandten Mengen spielte also die Selbstabsorption keine Rolle, so dass wir sie nicht zu berücksichtigen brauchten. Das ist aus Tabelle 5 ersichtlich, welche auch zeigt, dass zwischen der Menge der aktiven Substanz und der Impulsrate innerhalb der statistischen Abweichungen die geforderte Proportionalität besteht:

Tabelle 5

Mol Alanin	ipm	Mol Ala-Ser	ipm
$5,4 \cdot 10^{-6}$	7935 ± 150	$6,2 \cdot 10^{-6}$	9180 ± 200
$2,7 \cdot 10^{-6}$	4025 ± 80	$3,1 \cdot 10^{-6}$	4530 ± 100
$5,4 \cdot 10^{-7}$	780 ± 35	$6,2 \cdot 10^{-7}$	930 ± 40
$2,7 \cdot 10^{-7}$	405 ± 20	$3,1 \cdot 10^{-7}$	445 ± 20
$1,4 \cdot 10^{-7}$	270 ± 20	$1,5 \cdot 10^{-7}$	220 ± 20
$5,4 \cdot 10^{-8}$	82 ± 10	$6,2 \cdot 10^{-8}$	93 ± 10

2. Messgenauigkeit 44)

Da der radioaktive Zerfall ein vollständig zufälliges Ereignis ist, d. h. ein statistischer Vorgang, unterliegt er den Gesetzen der Wahrscheinlichkeitsrechnung. In der Zähl-Statistik verwendet man aus einer Reihe von praktischen und statistischen Gründen die sog. Normal-Verteilung, die der Gaußschen Fehlerverteilung ähnlich ist.

Ist $\bar{m}$ der Mittelwert der in der Zeit t gemessenen Impulse, so ist bei dieser Verteilung die Streuung (Standard-Abweichung) praktisch gleich $\sqrt{\bar{m}}$ und der statistische Fehler gleich $1/\sqrt{\bar{m}}$ oder, in % ausgedrückt, $100/\sqrt{\bar{m}}$.

Die Wahrscheinlichkeit, dass eine Einzelmessung m_i , sich vom Mittelwert $\bar{m}$ um weniger als die Streuung $\sqrt{\bar{m}}$ unterscheidet, ist rund 2/3. Durch eine nicht einwandfreie Zählordnung werden Schwankungen hervorgerufen, die der oben genannten Verteilungsfunktion nicht folgen.

Wie Tabelle 6 zeigt, treten bei unserer Messanordnung keine Schwankungen auf, die den statistischen Gesetzen nicht unterliegen.

Tabelle 6

$6,9 \cdot 10^{-7}$ Mol Alanin

Zeit Min.	Impulszahl m_i	Mittelwert m	Streuung $\sqrt{m}$	beo.Abweich. $m - m_i$
15	14120	14210	120	90
15	14340			130
15	14280			70
15	14095			115
15	14180			30
15	14265			55

Da bei allen in vorliegender Arbeit durchgeführten Aktivitätsbestimmungen mindestens 2500 Impulse, unabhängig von der hierzu benötigten Zeit, gezählt wurden, betrug der statistische Fehler unserer Messungen höchstens 2 %.

VI. K i n e t i k d e r S p a l t u n g i n n e u t r a l e m M e d i u m

1. Methodik der kinetischen Messungen

Eine charakteristische Eigenschaft der Serinpeptide ist, dass sie, im Gegensatz zu den anderen Peptiden, sich überraschend schnell in Wasser spalten. Die Untersuchungen von J. Heidberg ¹³⁾ über die Geschwindigkeit der Spaltung des Dipeptids Glycyl-Serin in reinem Wasser zeigten, dass z. B. bei einer Temperatur von 78,5° C tatsächlich in der kurzen Zeit von 4,2 Tagen 50 % der Anfangsmenge des Dipeptids gespalten war.

In Erweiterung der von J. Heidberg ausgeführten kinetischen Versuche und mit dem Ziel, Schlüsse über den Einfluss der verschiedenen Radikalen X auf die Stabilität bzw. Reaktivität der Peptidbindung der Serinpeptide des Typus X-Serin zu ziehen, haben wir in vorliegender Arbeit den Ablauf der hydrolytischen Spaltung des Dipeptids Alanyl-Serin und des Tripeptids Glycyl-Alanyl-Serin in reinem Wasser bei verschiedenen Temperaturen kinetisch verfolgt. Die von uns angestellten Messungen haben gezeigt, dass diese Peptide in Bezug auf ihre Reaktivität dem Wasser gegenüber sich leicht im Rahmen der Serinpeptidgruppe einordnen lassen. Wir stellten fest, dass sie sich noch etwas schneller als das Glycyl-Serin in reinem Wasser abspalten. Die rasche Hydrolyse des Alanyl-Serins und des Glycyl-Alanyl-Serins stellt also offenbar keinen Sonderfall in der Reihe der Serinpeptide dar.

Zunächst untersuchten wir die Hydrolyse des Alanyl-Serins in reinem Wasser, weil sein Hydrolysat sich sowohl chromatographisch als auch elektrophoretisch sehr gut trennen und aufarbeiten liess. Ausserdem war es Baustein des Tripeptids, dessen Spaltung in neutralem Medium wir ebenfalls studierten.

Für die Durchführung der Spaltung in neutralem Medium durfte nur reines Wasser verwendet werden, da sonst die in handelsüblichem destilliertem Wasser vorhandenen Ionen eventuell katalytisch wirksam sein könnten, und ausserdem weil die Peptidspaltung in Pufferlösungen oder mit Modellkatalysatoren, Fermenten usw. erst untersucht werden kann, wenn man über den Ablauf der Hydrolyse in reinem Wasser orientiert ist. Das vom Handel gelieferte destillierte Wasser wurde in einem Quarzapparat zweimal destilliert und danach in einem O_2 -Strom (gereinigt durch konz. Schwefelsäure und Natronlauge) unter Ausschluss von CO_2 aufgeköcht und wieder im O_2 -Strom abgekühlt.

Das auf diese Weise gewonnene bidestillierte Wasser wies bei Zimmertemperatur einen durchschnittlichen pH-Wert von 6,4 auf, der elektrometrisch mit einem pH-Meter gemessen wurde. Wir verwendeten zur Bestimmung des pH-Wertes eine Einstabmesskette, die an einen pH-Meter angeschlossen war. Als Einstabmesskette benutzten wir den von der Firma Dr. W. Ingold, Frankfurt/M, gelieferten Typ 403, bei welchem die Glas- und Bezugsselektrode in einem Rohr angebracht sind. In diesem Modell ist die Glaselektrode mit einem Puffer von pH 7 gefüllt und als Bezugsselektrode dient eine temperaturbeständige $Ag/AgCl$ -Elektrode. Der elektri-

sche Kontakt zwischen der zu messenden Flüssigkeit und der Bezugselektrode wird durch eine gesättigte KCl-Lösung hergestellt. Der Widerstand der Kette beträgt 10^8 Ohm.

Wir benutzten zur EMK-Messung das Präzisions-pH-Meter pH35 der Firma Knick, Berlin-Zehlendorf, dessen Messgenauigkeit bei dem Widerstand der verwendeten Messkette 0,5 mV bzw. 0,01 pH-Einheiten beträgt ⁴⁵⁾. Als Vergleichslösung zur Eichung des pH-Meters diente die vom National Bureau of Standards (USA) standardisierte Pufferlösung:

0,025 molal an Na_2HPO_4 und an KH_2PO_4 (pH 6,88 bei 20°C)
Zur Erhaltung eines konstanten pH-Wertes war es notwendig, die Messkette einige Stunden in das zu messende Wasser zu tauchen. Die so gemessenen pH-Werte des bidestillierten Wassers schwankten je nach der Tauchzeit zwischen 6,38 und 6,47 pH-Einheiten.

Wir stellten durch Einwaage und Auflösen in der entsprechenden Menge bidest. Wasser jeweils etwa 0,005 molare Lösungen des Peptids (44 mg Alanyl-Serin in 50 ml Wasser) her. Gleich darauf füllten wir je ca. 2,2 ml der Peptidlösung in Reagenzgläsern aus Fiolaxglas und schmolzen diese ab.

Zur Ermittlung der Geschwindigkeitskonstanten bei einer gegebenen Temperatur wurden 6 - 8 solcher Gläsern in mit Wasser gefüllte und mit Blei beschwerte Flaschen gegeben und in einen Lauda- oder Haake-Ultrathermostaten gebracht. Der Heizkörper dieser Thermostaten wurde über ein empfindliches Kontaktthermometer in Verbindung mit einem Quecksilber-Relais gesteuert. Die Temperaturkonstanz

der Thermostaten betrug in dem ganzen von uns untersuchten Temperaturbereich bei wochenlangem Betrieb ohne besondere weitere Massnahmen, bei sorgfältiger Wartung von Heizung und Kühlung mit Leitungswasser, mindestens $0,05^{\circ}\text{C}$.

Jeweils bei der Ermittlung einer Geschwindigkeitskonstanten wurde, gleich nachdem wir die Flaschen mit den Gläsern in den Thermostaten gebracht hatten, 1,00 ml der restlichen Peptidlösung direkt chromatographiert oder elektrophoresiert, aus dem Papier eluiert und seine Aktivität gemessen. Dies diente dazu, uns über den Spaltungsgrad bzw. die Reinheit des Peptids bei der Zeit $t = 0$ Aufschluss zu geben. Dieser als Nullprobe dienende Versuch ergab bei allen von uns untersuchten Peptiden eine Anfangskonzentration von durchschnittlich 99,7 %. Dies kommt daher, dass bei der Darstellung und Reinigung der Peptide trotz mehrmaliger Umkristallisation sehr kleine Mengen der bei der Synthese angewandten Reaktanten (hauptsächlich Aminosäuren) zurückblieben. Bei der Ermittlung der Geschwindigkeitskonstanten benutzten wir deshalb als Anfangskonzentration c_0 den sich aus der Nullprobe ergebenden Wert.

In vernünftigen Zeitabständen, die sich aus vorhergehenden Versuchen ergaben, entnahmen wir ein Gläschen, kühlten es in Leitungswasser (um die Hydrolyse zu unterbrechen) und pipettierten zwei Parallelproben von je 1,00 ml. Das entspricht $5 \cdot 10^{-6}$ Mol Peptid, also ca. 1 mg oder einer Aktivität von ungefähr 7000 ipm. Die Proben wurden in kleine Glasschälchen gegeben und die Lösung sofort in

flüssiger Luft eingefroren, um den Wasserüberschuss bequem entfernen zu können, denn die Hydrolysate mussten vor ihrer elektrophoretischen bzw. chromatographischen Trennung von überschüssigem Lösungsmittel befreit werden. Dafür brachten wir die Glasschälchen mit der eingefrorenen Lösung in einen Exsikkator und pumpten das Wasser über Silikagel, Ätznatron und P_2O_5 im Vakuum ab.

Nach einer Stunde war das Wasser quantitativ entfernt und am Boden der Schälchen blieb die feste Substanz in äusserst feiner Verteilung zurück. Während der Gefrier-trocknung der wässrigen Hydrolysatlösungen traten keine nachweisbaren Umwandlungen auf.

Den zunächst fast unsichtbaren Rückstand nahmen wir mit einigen Tropfen bidestillierten Wassers auf und trugen die Lösung mittels einer gut gerundeten Pipette längs einer Bleistiftmarkierung (Startlinie) auf den für die Chromatographie bzw. Elektrophorese bestimmten Papierbogen auf. Es wurde dreimal mit zwei Tropfen bidestillierten Wassers nachgespült; vor jeder Spülung trockneten wir die Aufbringungszone mit einem Föhn ab. Dann wurde das Hydrolysat wie vorher beschrieben chromatographiert bzw. elektrophoresiert.

Die Trennwirkungen der Hochspannungselektrophorese und der Papierchromatographie sind verschieden und ergänzen sich gegenseitig. Da aber die chromatographische Trennung im allgemeinen bequemer als die elektrophoretische ist, trennten wir nur den kleineren Teil der Hydrolysate zur

Kontrolle elektrophoretisch. Die Resultate der kinetischen Messungen sind bei beiden Trennmethoden die gleichen. Der Vorteil in der Anwendung der Elektrophorese liegt jedoch darin, dass die Trennung auch bei Anwesenheit von Elektrolyten rasch ausgeführt werden kann, und überdies gestattet sie in vielen Fällen den direkten Nachweis von Übergangs- und Nebenverbindungen und auch manchmal deren Strukturermittlung. Deshalb sollte man jede kinetische Untersuchung elektrophoretisch und chromatographisch kontrollieren. Dies haben wir in unseren Versuchen stets getan.

Das Alanyl-Serin bildet während der Wanderung im elektrischen Feld zwei nahe beieinander liegende Zonen von den apparenten Beweglichkeiten $v = 6,9$ und $v = 7,7$. Die Tatsache, dass das Alanyl-Serin bei der Elektrophorese (nicht aber bei der Chromatographie) in sein Diastereomerenpaar aufspaltet, lässt unsere kinetischen Ergebnisse unangestastet, da wir bei der Bestimmung der Peptidaktivität beide Zonen zusammenfassten, d. h. wir betrachteten die Summe beider Konzentrationen als die wirkliche Konzentration des Alanyl-Serins.

Die auf den Chromatogrammen und Pherogrammen mitgelaufenen Vergleichsflecken der reinen Stoffe gestatteten eine eindeutige Zuordnung der Banden des Ausgangs-peptids und der bei der Hydrolyse entstandenen Aminosäuren. Nach Festlegung der Zonenlage auf den Papieren auf Grund ihrer Fluoreszenz im UV-Licht schnitten wir die Substanzbanden in Streifen aus, eluierten diese nach Art der absteigenden

Chromatographie mit bidestilliertem Wasser und fingen die Eluate in Aluminiumschälchen auf, welche in den Probenwechsler des Zählgerätes passten. Dann dampften wir die Lösungen langsam unter einer Infrarotlampe ein.

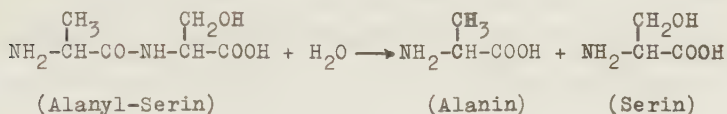
Die Aktivität der trockenen Präparate zählten wir in dem Methandurchflusszähler FH 51 mit dem 2π -Zählrohr FH 512 der Firma Frieske und Hoepfner, Erlangen-Bruck, aus. Bei der Aktivitätsbestimmung der Proben eines Hydrolysats wurden stets die Messbedingungen (Geometriefaktor, Streuung, Selbstabsorption) konstant gehalten.

Die genaue Beschreibung der Arbeitsmethodik und der äusseren Bedingungen bei der Chromatographie, der Elektrophorese und der Aktivitätsbestimmung ist in den Absätzen IV und V vorliegender Arbeit gegeben.

In analoger Weise behandelten wir das Tripeptid Glycyl-Alanyl-Serin. Je ca. 1,1 ml der 0,004 molaren Tripeptidlösung wurden in Fiolaxgläschen eingeschmolzen und in den Ultrathermostaten bei drei verschiedenen Temperaturen hydrolysiert. In angemessenen Zeitabständen entnahmen wir ein Gläschen, öffneten es und pipettierten 1,00 ml. Wir gaben die Lösung in ein Glasschälchen, froren sie mit flüssiger Luft ein und entfernten das Wasser in einem Vakuumexsikkator. Die Stoffe des festen Hydrolysatrückstands, in einigen Tropfen bidest. Wasser gelöst, wurden chromatographisch getrennt, die getrennte Zone aus dem Papier eluiert, die Eluate getrocknet und durch Bestimmung ihrer Radioaktivität quantitativ erfasst.

2. Theoretische Betrachtungen und Ergebnisse

Nach den bisher bei der Peptidspaltung gewonnenen Erfahrungen^{11,12,13)} sollte die Hydrolyse des Alanyl-Serins und des Glycyl-Alanyl-Serins in neutralem Medium nach einem Zeitgesetz erster Ordnung bezüglich des Peptides verlaufen, denn obwohl das Wasser mit in die Reaktionsgleichung eingeht:



rithmen der Peptidkonzentration c als Funktion der Zeit t in befriedigender Weise längs einer Geraden anordnen, was in Übereinstimmung mit der integrierten Form des Zeitgesetzes für Reaktionen von erster Ordnung steht:

$$k \cdot t = \ln \frac{c_0}{c}$$

Die im Methandurchflusszähler gemessenen Aktivitäten waren den Mengen proportional. Da wir immer gleiche Volumina der Lösung analysierten, waren auch die Aktivitäten der Konzentration der Peptide bzw. Aminosäuren proportional.

Zur Ermittlung der Geschwindigkeitskonstanten k benutzten wir eine graphische Methode. Wir trugen in einem Koordinatensystem mit dem Logarithmus des Peptid-Prozentsatzes als Ordinate und mit der Zeit (in Stunden h oder Tagen d) als Abszisse die jeweiligen Werte der Peptidkonzentration ein. In diesen Diagrammen gab der Abfall der Peptidmenge mit der Zeit eine Gerade wieder. Daraus lasen wir die Halbwertszeiten τ ab und berechneten die zugehörigen Geschwindigkeitskonstanten k nach:

$$k = \frac{\ln 2}{\tau} = \frac{0,693}{\tau}$$

Der Fehler der τ - bzw. k -Werte bei dieser graphischen Ermittlung betrug maximal 3 %. Wir benutzten die graphische Methode, weil das rechnerische Verfahren bei viel grösserem Aufwand keine genaueren Ergebnisse lieferte.

Wir massen bei jedem Hydrolysat die Gesamtaktivität, weil während der relativ langen Versuchszeiten zur Bestimmung einer Konstanten k die exakte Aufrechterhaltung der

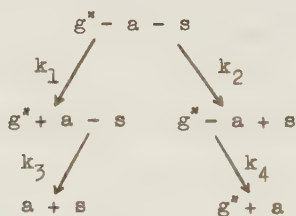
gleichen Messbedingungen nicht möglich war. So massen wir bei der Spaltung des Dipeptids die mit der Zeit zunehmende Menge des Spaltproduktes, also die Aminosäure (a^*), sowie die abnehmende Menge des Dipeptids (a^*-s). Auf diese Weise wurde man ausserdem unabhängig von eventuellen Substanzverlusten während der Aufarbeitung der Hydrolysate, denn diese wurden als Ganzes betroffen.

Bei einem Tripeptid ist die Auswertung sämtlicher Konstanten k_i schwieriger, wenn beide Peptidbindungen gespalten werden und die gebildeten Dipeptide auch weiter zu den Aminosäuren zerfallen. Man muss mindestens die Konzentration dreier Spaltprodukte als Funktion der Zeit messen können; dann lassen sich die Konzentrationen der anderen drei Hydrolysatkomponenten rechnerisch erfassen. Im Falle unseres Tripeptids jedoch findet die Spaltung in Wasser, wie zu erwarten war, nur an einer der Peptidbindungen statt, u. z. an der dem Serin benachbarten Bindung, während die Spaltung an der anderen Bindung praktisch Null ist.

Dieses spezielle Verhalten des Glycyl-Alanyl-Serins gegenüber dem Wasser war im Einklang mit den Erfahrungen, die bisher in diesem Institut bei der neutralen Hydrolyse von Peptiden gewonnen worden sind. Die nichtserinhaltigen Peptide spalten sich in Wasser, wie die Untersuchungen von J. Fernandez ⁴⁶⁾ zeigen, fast unmessbar langsam. Die von J. Fernandez durchgeführten kinetischen Messungen der Hydrolyse des Dipeptids Glycyl-Alanin in neutralem Medium ergaben, dass z. B. bei 78° C erst nach der sehr langen Zeit von ungefähr 1000 Tagen 50 % des Dipeptids hydrolysiert war.

Da erfahrungsgemäss die Spaltung der der NH_2 -Gruppe benachbarten Bindung A-BC eines Tripeptids A-B-C in der selben Grössenordnung liegt wie die des entsprechenden Dipeptids A-B, war es also zu erwarten, dass bei der höchsten von uns untersuchten Temperatur (75°C) die Halbwertszeit der Spaltung des Tripeptids g-a-s an der Bindung g-as ca. 4 Jahre betragen würde. Das war tatsächlich der Fall. Während nach zwei Tagen 53 % der Anfangsmenge des Tripeptids an der Bindung g-a-s gespalten, also die halbwertszeit schon überschritten war, fanden wir keine messbare Spaltung der g-as-Bindung.

Das Schema des theoretisch möglichen direkten Zerfalls unseres Tripeptids zu den niederen Peptiden und Aminosäuren ist folgendes:



Da in Wasser innerhalb der ersten Wochen und bei Temperaturen, die unter 75°C liegen, keine merkliche Spaltung weder des Tripeptids an der g-as-Bindung noch des in- zwischen gebildeten Dipeptids g-a stattfindet, ist man berechtigt, k_1 und k_4 gleich Null zu setzen. Da ausserdem kein Dipeptid a-s gebildet wird, fehlt die Konstante k_3 , die sonst einen von Null verschiedenen Wert haben würde, weg.

Die Spaltung des Tripeptids in Wasser vereinfacht sich

dann zu:
$$g^* - a - s \xrightarrow{k_2} g^* - a + s$$

Die gesamte Geschwindigkeitskonstante k , die gleich der Summe $k_1 + k_2$ ist, wird praktisch gleich k_2 :

$$k_1 \approx 0 \quad ; \quad k = k_1 + k_2 \approx k_2$$

so dass die Hydrolyse des Tripeptids in Wasser rechnerisch wie die eines Dipeptids behandelt werden kann.

In der Tat fanden wir bei der Tripeptidspaltung, dass sich kein Glycin bildete, sondern nur Glycyl-Alanin und Serin. Wir massen in angemessenen Zeitabständen die Konzentrationen (Aktivitäten) des entstandenen Dipeptids $g^* - a$ und des restlichen Tripeptids. Im Diagramm $\log[ipm \text{ (in \%)}]$ gegen t wurde der Abfall der Tripeptidkonzentration mit der Zeit durch eine Gerade wiedergegeben. Die Halbwertszeiten wurden daraus graphisch ermittelt. Die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten k erhielten wir aus: $k = 0,693/\tau$
Ihre Unsicherheit liegt bei 3 %.

Zur Berechnung der Aktivierungsenergien E und der Aktivitätskonstanten A aus den so erhaltenen Konstanten k verwendeten wir die Arrheniussche Gleichung:

$$k = A e^{-E/RT} \quad (1)$$

Wenn die Arrheniussche Gleichung gilt, sollte man bei der Darstellung von $\log k$ gegen $1/T$ eine Gerade erhalten.

Die Grösse A ist allerdings eine Funktion der Temperatur, deren Einfluss auf k sich vor allem bei hohen Temperaturen bemerkbar macht, wenn der Exponentialfaktor gegen 1 strebt. Eine exaktere Darstellung der Temperaturabhängigkeit von k (Kassel ⁴⁷) berücksichtigt die Tem-

peraturabhängigkeit von A :

$$k = A_0 T^m e^{-E_0/RT} \quad (2)$$

Diese Gleichung, die vielfach zur Auswertung empirischer Messergebnisse angewandt worden ist, ist auch theoretisch begründet. A_0 ist ein temperaturunabhängiger Faktor, E_0 die theoretische Aktivierungsenergie und m ein Temperaturexponent, dessen Wert von der angewandten Theorie und der betrachteten Reaktion abhängt. Der Exponent m beträgt -2 bis $1/2$ je nach der Art der Ausgangsstoffe und des aktivierten Komplexes. E_0 gibt die Differenz zwischen den Nullpunkt-Energien des aktivierten Komplexes und der Reaktanten, aus denen er gebildet wird, wieder.

Die Differenz von E und E_0 ergibt sich durch Differentiation von Gl. (2) nach T und Gleichsetzung des Differentials mit Gl. (1):

$$E_0 = E - m R T$$

Der Unterschied zwischen beiden Aktivierungsenergien beträgt meist einige Hundert Kalorien pro Mol. Wenn die Kasselsche Gleichung (2) gilt, muss die Darstellung von $\log k$ gegen $1/T$ eine leicht gekrümmte Kurve ergeben.

Da bei dem kleinen von uns betrachteten Temperaturintervall keine Temperaturabhängigkeit des A-Faktors festzustellen ist (beide Gleichungen ergeben im Diagramm von $\log k$ gegen $1/T$ bei diesem T-Bereich eine Gerade) haben wir für die Berechnung von E und A die Arrheniussche Formel herangezogen, d. h. wir haben angenommen, dass der Exponent m gleich Null ist. In diesem Fall geht die theoretische Formel in die empirische über.

Man kann auch beweisen, dass der Fehler, den man begeht, wenn man sogar bei dem relativ grossen Temperaturintervall von $\Delta T = 700^\circ$, die Aktivierungsenergie und den A-Faktor anstatt mit Gl. (2) mit der Arrheniusschen Gleichung berechnet, nicht grösser als 10 % im ganzen Temperaturbereich ist ⁴⁸⁾. Die Geschwindigkeitskonstanten dürfen, mindestens in dem thermischen Bereich von Zimmertemperatur bis zu 1000° K , mit hinreichender Genauigkeit durch die Arrheniussche Gleichung ausgedrückt werden. Hierbei gibt es keinen grossen Unterschied zwischen dem empirischen Wert E und dem theoretischen E_0 ⁴⁸⁾.

Durch Logarithmieren der Arrheniusschen Formel ergibt sich:

$$\log k = \log A - \frac{E}{2,303 RT}$$

Dies ist eine lineare Gleichung, die eine Gerade definiert. Deshalb kann man aus der Darstellung von $\log k$ gegen $1/T$ die Aktivierungsenergie und den A-Faktor graphisch ermitteln. Die Steigung der Geraden ist gleich $- E/2,303 RT$ und die Strecke, die von der Geraden auf der y-Achse abgeschnitten wird, gleich $\log A$.

Diese graphische Methode zur Ermittlung von E und A , die wir herangezogen haben, lieferte die gleichen Werte, die sich unter Zugrundelegung einer Ausgleichsrechnung (Methode der kleinsten Quadrate) beim Einsetzen der bei 4 bzw. 3 Temperaturen gefundenen k-Werte ergaben.

Der mittlere Fehler der Arrheniusschen Aktivierungsenergie betrug ca. 0,4 kcal/Mol, wenn für den relativen Fehler der Geschwindigkeitskonstanten 3 % gesetzt und die Temperaturunbestimmtheit vernachlässigt wurde.

Aus den Messungen der Geschwindigkeitskonstanten k kann auch die Aktivierungsentropie ΔS^{++} , die Aktivierungsenthalpie ΔH^{++} und die freie Enthalpie der Aktivierung ΔG^{++} berechnet werden. Die Grössen ΔS^{++} , ΔH^{++} und ΔG^{++} kann man auffassen als die Unterschiede in der Entropie, Enthalpie und freien Enthalpien zwischen dem aktivierten Komplex im Standardzustand und den Stoffen, aus denen er gebildet wird, ebenfalls in deren Standardzuständen. Im allgemeinen verwendet man als Standardzustand für die an der Reaktion beteiligten Stoffe und den aktivierten Komplex den Zustand, in dem sie in der Konzentration (oder Aktivität) eins vorliegen, wobei dieselbe Konzentrationseinheit wie bei der Angabe der Geschwindigkeitskonstanten k benutzt wird.

Zur Berechnung der Aktivierungsentropie benutzt man folgende im Zusammenhang mit dem A-Faktor stehende Beziehung ⁴⁹⁾:

$$A = e^j \cdot \frac{k_B T}{h} \cdot e^{\Delta S^{++}/R}$$

wobei k_B die Boltzmann-Konstante, h das Plancksche Wirkungsquantum und R die Gaskonstante bedeuten. Der Exponent j ist gleich $2-m$ oder $1-m$, je nachdem, ob es sich um eine Reaktion in der Gasphase oder in Lösung handelt.

Da in unserem Fall die Reaktionen in Lösung stattfinden und wir ausserdem angenommen haben, dass der Temperatur-exponent m der Kasselschen Gleichung Null ist, ergibt sich:

$$A = e \cdot \frac{k_B T}{h} \cdot e^{\Delta S^{++}/R}$$

oder, nach ΔS^{++} aufgelöst:

$$\Delta S^{++} = 4,574 \left[\log A - \log \left(e \cdot \frac{k_B T}{h} \right) \right]$$

Wir haben bei der Berechnung der Aktivierungsentropien unserer Reaktionen die Temperatur gewählt, die dem mittleren Wert des von uns betrachteten thermischen Intervalls, also 63°C , entspricht. Den mittleren Fehler der Aktivierungsentropie berechneten wir aus der Differenz der bei 63°C und bei den extremen Temperaturen (50° und 75°) ermittelten ΔS^{++} -Werte.

Aus den erhaltenen Aktivierungsenergien und Aktivierungsentropien kann man leicht ΔH^{++} und ΔG^{++} berechnen.

Bei Reaktionen in Lösung gilt für die Aktivierungsenthalpie 49):

$$\Delta H^{++} = E - RT$$

Bei dem von uns herangezogenen Temperaturintervall ist also:

$$\Delta H^{++} \approx E - 700 \text{ cal/Mol}$$

Für die freie Aktivierungsenthalpie gilt per definitionem:

$$\Delta G^{++} = \Delta H^{++} - T \Delta S^{++}$$

Auf der nächsten Seite findet man die Tabelle der Ergebnisse, wobei die Tripeptid-Werte nur als annähernd zu betrachten sind. Auf den folgenden Seiten befinden sich die graphischen Darstellungen des zeitlichen Verlaufs der neutralen Hydrolyse des Alanyl-Serins und des Glycyl-Alanyl-Serins, sowie die entsprechenden Arrheniusschen Geraden.

Die Aktivitätsmesswerte sind im Anhang tabelliert. Sie geben die gezählten Impulse pro Minute (ipm) an; in Wirklichkeit stellen sie Mittelwerte aus Messungen dar, die sich meist über 10 Minuten erstreckten.

Tabelle der Ergebnisse

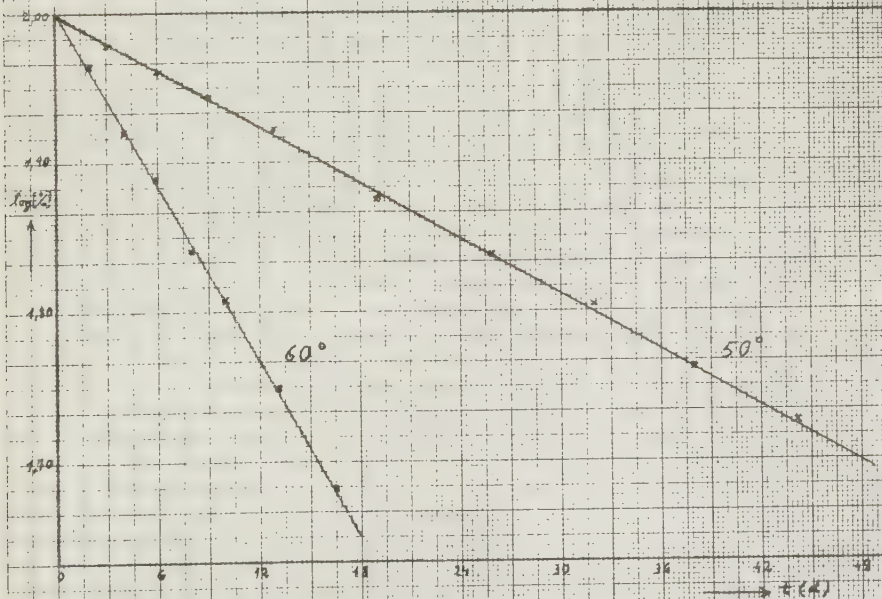
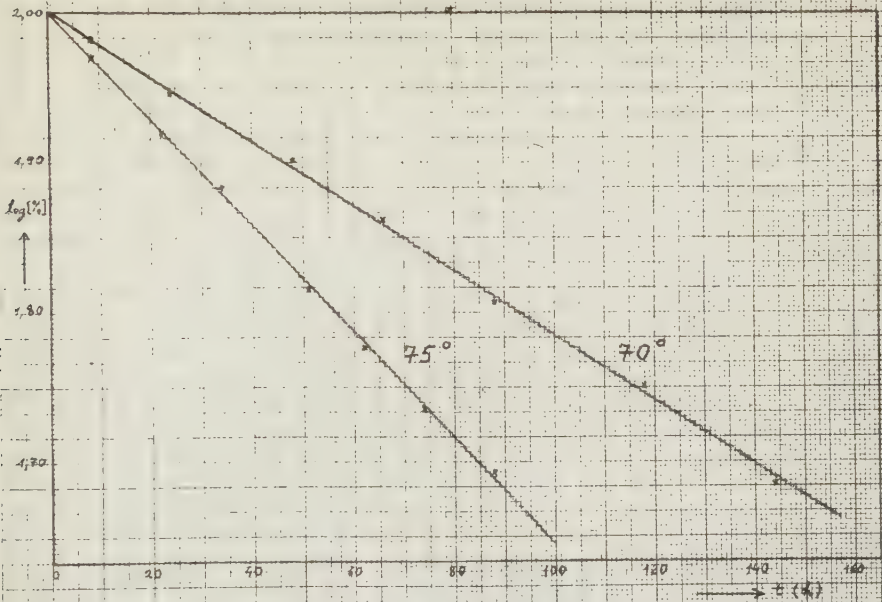
Hydrolyse des Alanyl-Serins in reinem Wasser

50° C	$\tau = 1147 \text{ h} = 47,8 \text{ d}$	$k = 0,0145 \text{ d}^{-1}$
60° C	$\tau = 368 \text{ h} = 15,33 \text{ d}$	$k = 0,0452 \text{ d}^{-1}$
70° C	$\tau = 139 \text{ h} = 5,79 \text{ d}$	$k = 0,119 \text{ d}^{-1}$
75° C	$\tau = 84,5 \text{ h} = 3,52 \text{ d}$	$k = 0,197 \text{ d}^{-1}$
E = $23,2 \pm 0,3$ kcal/Mol		
log A = $13,9 \pm 0,2$ (A in d^{-1})		
$\Delta S^{++} = -19,7 \pm 0,4$ cal/Grad		
$\Delta G^{++} = 29,1 \pm 0,3$ kcal/Mol		

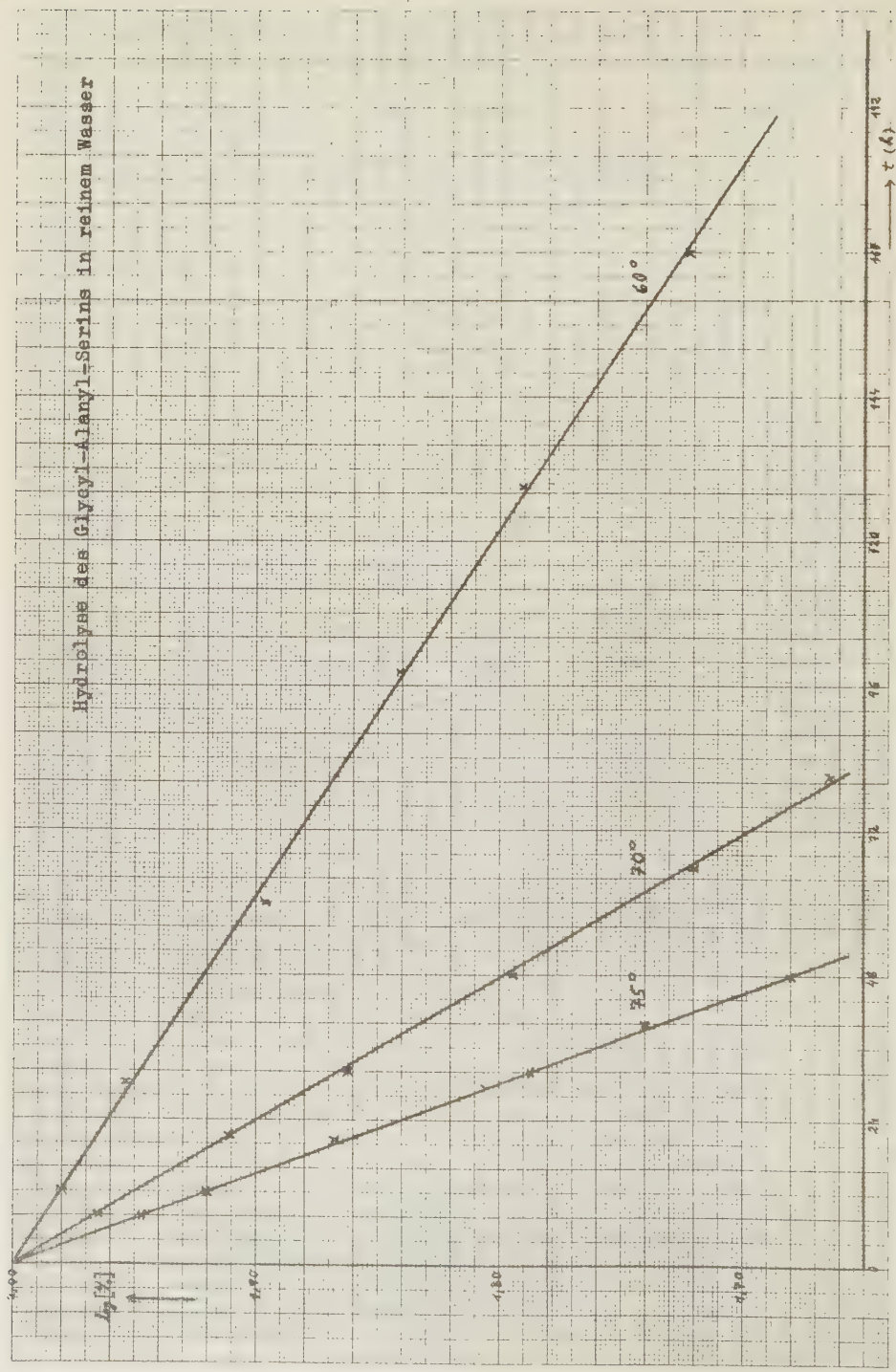
Hydrolyse des Glycyl-Alanyl-Serins in reinem Wasser

60° C	$\tau = 183 \text{ h} = 7,63 \text{ d}$	$k = 0,0908 \text{ d}^{-1}$
70° C	$\tau = 71,5 \text{ h} = 2,98 \text{ d}$	$k = 0,233 \text{ d}^{-1}$
75° C	$\tau = 45,1 \text{ h} = 1,88 \text{ d}$	$k = 0,369 \text{ d}^{-1}$
E = $21,5 \pm 0,5$ kcal/Mol		
log A = $13,2 \pm 0,3$ (A in d^{-1})		
$\Delta S^{++} = -22,9 \pm 0,4$ cal/Grad		
$\Delta G^{++} = 28,5 \pm 0,5$ kcal/Mol		

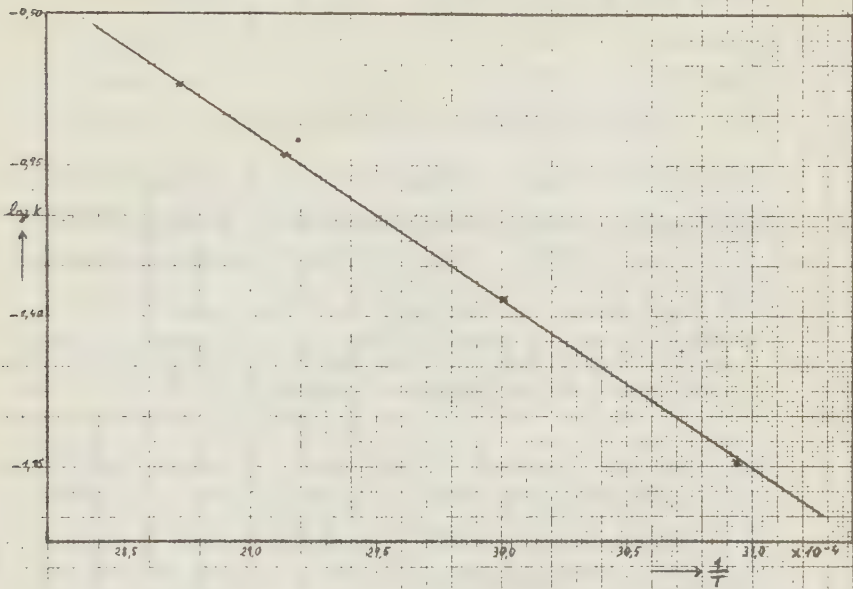
Hydrolyse des Alanyl-Serins in reinem Wasser



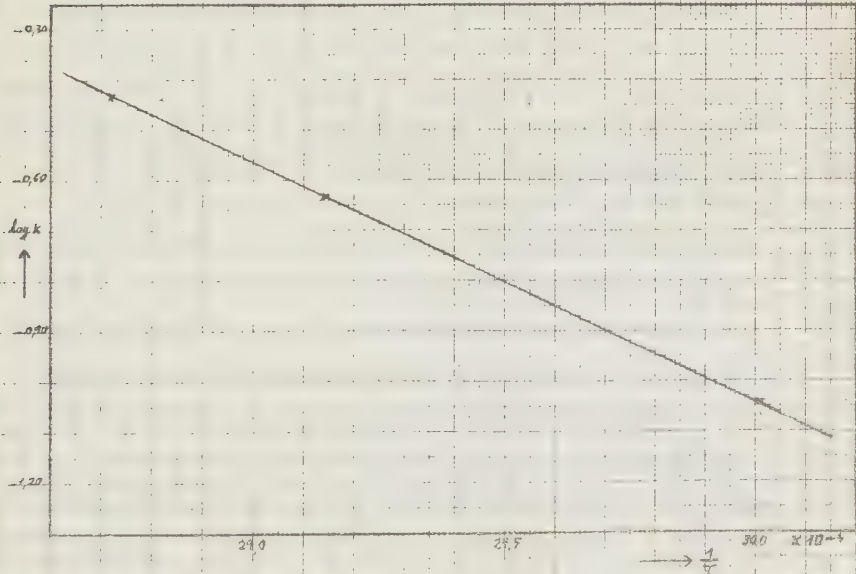
Hydrolyse des Glycyl-Alanyl-Serins in reinem Wasser



Arrheniussche Gerade für die Hydrolyse
des Alanin-Serins in reinem Wasser



Arrheniussche Gerade für die Hydrolyse
des Glycyl-Alanin-Serins in reinem Wasser



VII. K i n e t i k d e r S p a l t u n g i n a l k a l i s c h e m M e d i u m

1. Methodik der kinetischen Messungen

Nachdem in unserem Institut die Kinetik der hydrolytischen Spaltung von serinhaltigen Peptiden in saurem Medium untersucht worden war ¹³⁾ und wir sie in neutralem Medium studiert hatten, entschlossen wir uns, um das Bild der Kinetik im ganzen pH-Bereich zu vervollständigen, die Serinpeptide auch alkalisch zu hydrolysieren.

Wie bei der neutralen Hydrolyse arbeitet man, um den Verlauf der Spaltung zu verfolgen, mit Hilfe von chromatographischen und elektrophoretischen Methoden, unter Anwendung von Isothopen (C-14).

Kinetische Versuche über die Spaltbarkeit der Peptidbindungen von nichtserinhaltigen Peptiden in alkalischem Medium unter dem Einfluss benachbarter Substituenten wurden schon von J. Heintges ¹²⁾ angestellt. Heintges hydrolysierte eine Reihe von Normalpeptiden in 0,1 n NaOH bei verschiedenen Temperaturen.

Um die zu erwartenden Messergebnisse mit den von Heintges erhaltenen vergleichen zu können, hydrolysierten wir die Serinpeptide unter den gleichen Versuchsbedingungen, wie Heintges sie bei seinen Studien anwandte. Wir spalteten die Serinpeptide Glycyl-Serin und Alanyl-Serin ebenfalls in 0,1 n NaOH bei vier verschiedenen Temperaturen.

Ausserdem wurden, um festzustellen, ob die Hydroxidionen-

konzentrationen mit in die Reaktionsgleichung eingeht, die genannten Peptide auch bei höheren OH-Ionenkonzentrationen hydrolysiert. Tatsächlich gehen die OH-Ionen in die Reaktionsgleichung ein. Es handelt sich also um keine echte Katalyse, da für 1 Mol Peptid 1 Mol der Base verbraucht wird. Wir beschränkten uns deshalb meist auf die Messung der Spaltungsgeschwindigkeit während der ersten Halbwertszeit und weil ausserdem bei weiterem Fortschreiten der Reaktion unerwünschte Nebenreaktionen auftreten konnten, die eventuell die Auswertung der Messergebnisse erschwert oder verfälscht hätten.

Falls die Konzentration der katalysierenden Base hoch genug ist und diejenige des Peptids niedrig genug, kann die hydrolytische Spaltung als eine Reaktion erster Ordnung bezüglich des Peptids angesehen werden. Diese Bedingungen waren hinreichend erfüllt, wenn man eine Lösung hydrolysierte, die 0,005 molar an Peptid und 0,1 bis 0,5 molar an NaOH war.

Die Durchführung der Hydrolyse in alkalischem Medium war, bis auf wenige Abänderungen, die gleiche wie bei der neutralen Hydrolyse beschrieben. Wir setzten von den zu untersuchenden Peptiden 0,005 molare Lösungen in 0,1 n, 0,2 n und teilweise auch in 0,5 n NaOH an. Diese alkalischen Peptidlösungen wurden in 2,2 ml-Portionen mittels einer Mikropipette auf Fiolaxgläsern verteilt, in diesen eingeschmolzen und in Ultrathermostaten bei 50°, 60°, 70° und 75° C gelagert. Zur Ermittlung jeder einzelnen Geschwindigkeitskonstanten wurden 6 - 8 Gläsern hydrolysiert.

Beim Beginn der Hydrolyse ($t = 0$) wurde die Aktivität von 1,00 ml der Peptidlösung, nach chromatographischer oder elektrophoretischer Behandlung, gemessen. Dies gab uns die Anfangskonzentration des Peptids.

In angemessenen Zeitabständen, die sich durch vorhergehende Versuche abschätzen liessen, entnahmen wir ein Gläschen, kühlten es und pipettierten zwei Parallelproben von je 1,00 ml. Die Proben wurden in Glasschälchen gegeben und durch Zugabe der äquivalenten Menge einer 0,5 n HCl-Lösung die Natronlauge neutralisiert, um die Hydrolyse zu unterbrechen und weil sonst das NaOH störend auf die Chromatogramme wirkt (Verwaschung der Zonen). Das gebildete NaCl stört dagegen bei der chromatographischen Trennung nicht. Eine geringe Übersäuerung war unbedeutend, da das überschüssige HCl bei der darauffolgenden Gefriertrocknung mit flüssiger Luft im Vakuumexsikkator zusammen mit dem Wasser entfernt wurde.

Am Boden der Schälchen blieb das trockene Hydrolysat als dünner Film angehaftet. Der Rückstand wurde in wenig bid. Wasser aufgelöst und die Hydrolysatskomponenten, wie vorher geschildert, chromatographisch oder elektrophoretisch getrennt. Nach der Trennung konnte die Verteilung der Substanzen auf den Papieren durch ihre Fluoreszenz im UV-Licht festgestellt werden. Die isolierten Spaltprodukte wurden nach ihrer Elution und Trocknung durch Messung ihrer Radioaktivität quantitativ erfasst.

2. Ergebnisse und graphische Darstellungen

Obwohl bei der alkalischen Hydrolyse Hydroxidionen verbraucht werden, konnten wir für die Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten stets die Gleichung für Reaktionen von erster Ordnung anwenden, da die OH-Ionen im Überschuss vorhanden waren.

Für die Spaltungsgeschwindigkeit unserer Peptide in wässriger NaOH-Lösung können wir ansetzen:

$$- \frac{dp}{dt} = k' p w b$$

wobei p die Konzentration des Peptids, w des Wassers und b der Base bedeuten. Die Reaktion ist von dritter Ordnung. Da jedoch während der Reaktion die Konzentration des Wassers, das als Lösungsmittel dient, sich praktisch nicht ändert und die Hydroxidionen in hinreichendem Überschuss vorliegen ($b:p > 20$), kann man die Konzentrationen w und b mit in die Geschwindigkeitskonstante k' einschliessen:

$$- \frac{dp}{dt} = k p$$

Praktisch ergibt sich, dass sich bei dem Reaktionsverlauf lediglich die Konzentration des Peptids verändert. Die Reaktion ist also von pseudo-erster Ordnung.

Die katalytische Wirksamkeit hängt nicht von der Stärke der verwendeten Base ab, aber die Geschwindigkeitskonstanten k sind der OH-Konzentration proportional. Jede Konstante erster Ordnung k kann deshalb als Produkt der entsprechenden Konstante zweiter Ordnung k'' und der Hydroxidionen-Konzentration angesehen werden:

$$k = k'' b$$

Wir haben die Hydrolyse des Glycyl-Serins und des Alanyl-Serins in 0,1 n NaOH bei 4 verschiedenen Temperaturen ausgeführt. Ausserdem haben wir auch, um die Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten mit der Basenkonzentration festzustellen, das Alanyl-Serin in 0,2 n NaOH bei 4 Temperaturen und in 0,5 n NaOH bei einer Temperatur, sowie das Glycyl-Serin bei 0,2 n NaOH und einer Temperatur hydrolysiert.

Unsere Messergebnisse zeigen, dass bei Verdoppelung der Hydroxidionenkonzentration die Geschwindigkeitskonstanten k zwei- bis dreimal grösser werden.

Wie bei der Spaltung in reinem Wasser massen wir bei jedem Hydrolysat die Aktivität aller markierten Bestandteile. Im Diagramm $\log [\text{ipm (in \%)}]$ gegen die Zeit t wurde der Abfall der Peptide durch Geraden wiedergegeben. Aus ihnen konnten wir die Halbwertszeiten τ ablesen und die entsprechenden Geschwindigkeitskonstanten nach $k = \ln 2/\tau$ berechnen. Aus der Streuung der Messpunkte um die Geraden ergibt sich ein mittlerer Fehler der k -Werte von 3 %.

Aus den erhaltenen Konstanten k ermittelten wir graphisch die Aktivierungsenergien E und die Aktionskonstanten A auf Grund der Arrheniusschen Gleichung. Der mittlere Fehler der E -Werte betrug 0,4 kcal/Mol.

Zur Berechnung der Aktivierungsentropien ΔS^{++} , Aktivierungsenthalpien ΔH^{++} und freien Enthalpien der Aktivierung ΔG^{++} verwendeten wir die in Absatz VI 2 erörterten Gleichungen. Wie dort erwähnt, beträgt die Aktivierungsenthalpie in unserem T-Bereich $\Delta H^{++} = E - 0,7 \text{ kcal/Mol.}$

Tabelle der Ergebnisse

Hydrolyse des Alanyl-Serins in 0,1 n NaOH

50° C	$\tau = 41,0 \text{ h}$	$k = 0,405 \text{ d}^{-1}$
60° C	$\tau = 16,9 \text{ h}$	$k = 0,984 \text{ d}^{-1}$
70° C	$\tau = 8,6 \text{ h}$	$k = 1,936 \text{ d}^{-1}$
75° C	$\tau = 5,8 \text{ h}$	$k = 2,887 \text{ d}^{-1}$

$$E = 16,9 \pm 0,4 \text{ kcal/Mol} ; \log A = 11,1 \pm 0,2 \text{ (A in d}^{-1}\text{)}$$

$$\Delta S^{++} = -32,5 \pm 0,6 \text{ cal/Grad} ; \Delta G^{++} = 27,1 \pm 0,4 \text{ kcal/M}$$

Hydrolyse des Alanyl-Serins in 0,2 n NaOH

50° C	$\tau = 12,8 \text{ h}$	$k = 1,30 \text{ d}^{-1}$
60° C	$\tau = 6,0 \text{ h}$	$k = 2,77 \text{ d}^{-1}$
70° C	$\tau = 2,78 \text{ h}$	$k = 5,984 \text{ d}^{-1}$
75° C	$\tau = 2,04 \text{ h}$	$k = 8,155 \text{ d}^{-1}$

$$E = 16,7 \pm 0,4 \text{ kcal/Mol} ; \log A = 11,4 \pm 0,2 \text{ (A in d}^{-1}\text{)}$$

$$\Delta S^{++} = -31,2 \pm 0,6 \text{ cal/Grad} ; \Delta G^{++} = 26,5 \pm 0,4 \text{ kcal/M}$$

Hydrolyse des Glycyl-Serins in 0,1 n NaOH

50° C	$\tau = 22,6 \text{ h}$	$k = 0,735 \text{ d}^{-1}$
60° C	$\tau = 10,6 \text{ h}$	$k = 1,568 \text{ d}^{-1}$
70° C	$\tau = 5,4 \text{ h}$	$k = 3,094 \text{ d}^{-1}$
75° C	$\tau = 3,7 \text{ h}$	$k = 4,496 \text{ d}^{-1}$

$$E = 16,1 \pm 0,5 \text{ kcal/Mol} ; \log A = 10,8 \pm 0,3 \text{ (A in d}^{-1}\text{)}$$

$$\Delta S^{++} = -33,9 \pm 0,6 \text{ cal/Grad} ; \Delta G^{++} = 26,8 \pm 0,5 \text{ kcal/M}$$

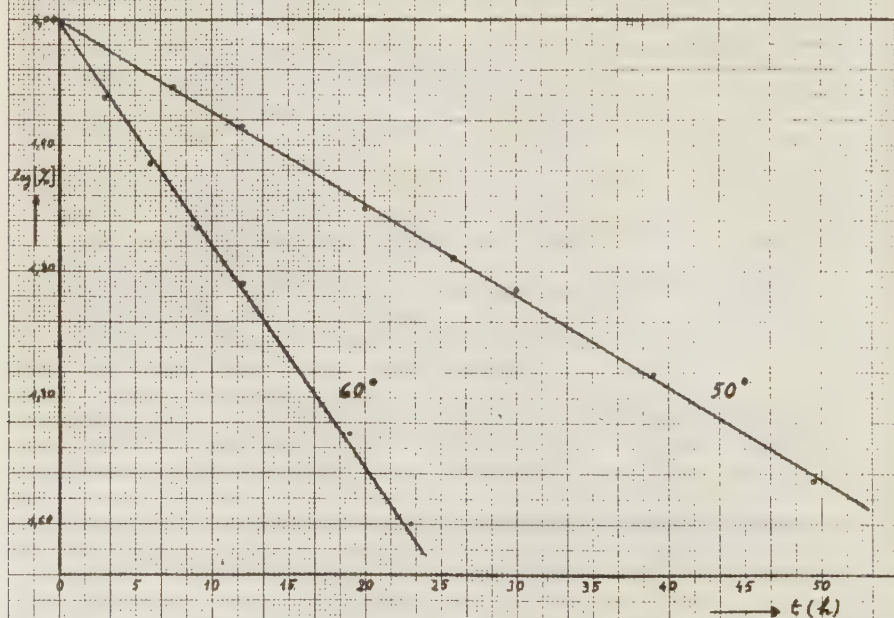
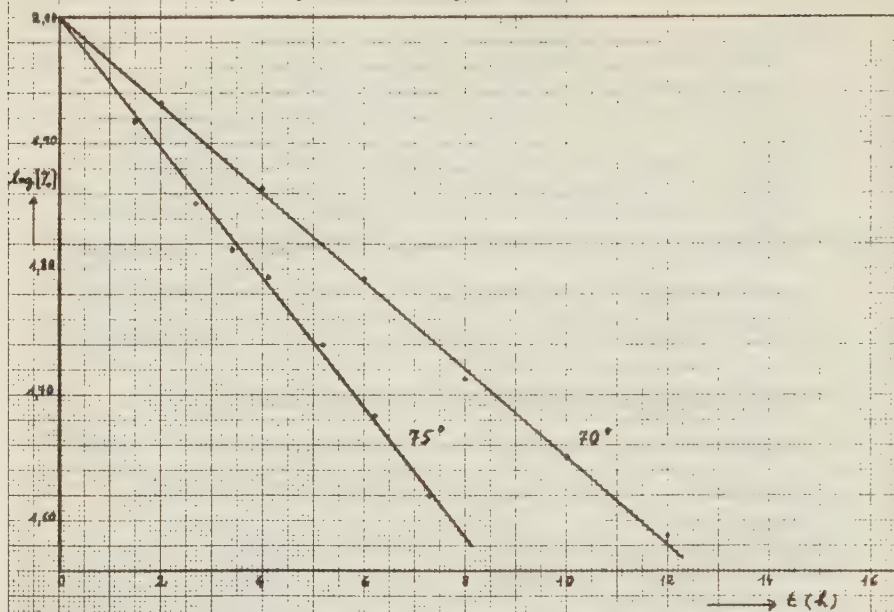
Hydrolyse des Glycyl-Serins in 0,2 n NaOH

60° C	$\tau = 3,9 \text{ h}$	$k = 4,266 \text{ d}^{-1}$
-------	------------------------	----------------------------

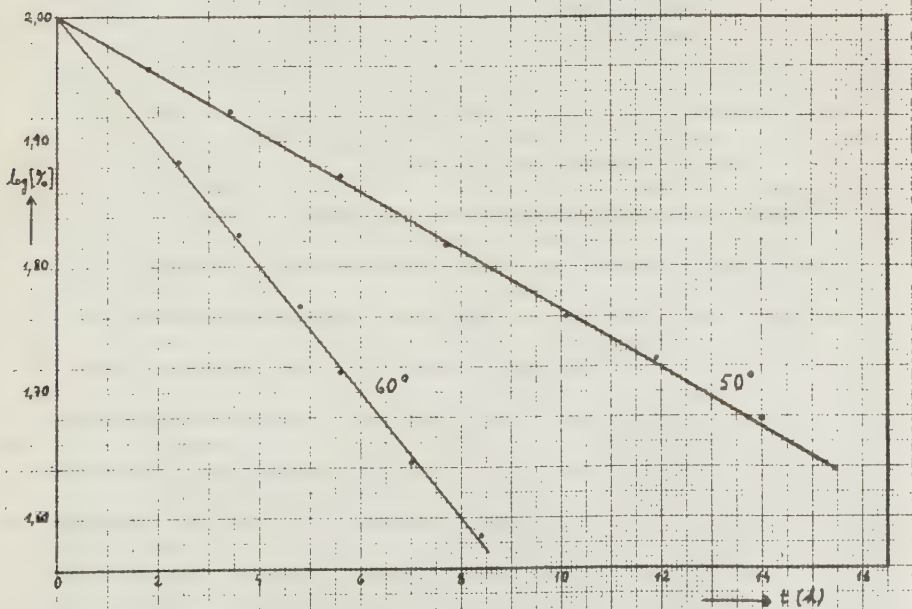
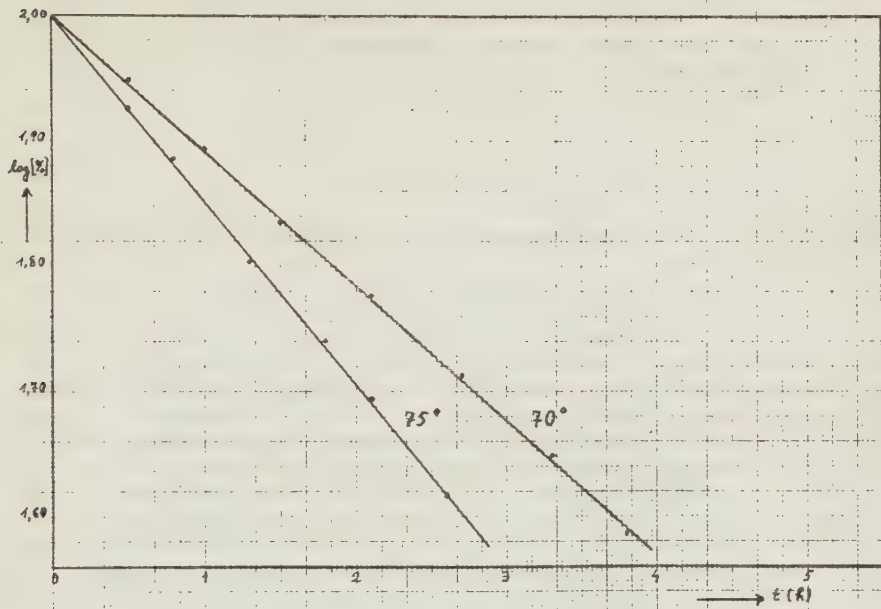
Hydrolyse des Alanyl-Serins in 0,5 n NaOH

60° C	$\tau = 2,1 \text{ h}$	$k = 7,920 \text{ d}^{-1}$
-------	------------------------	----------------------------

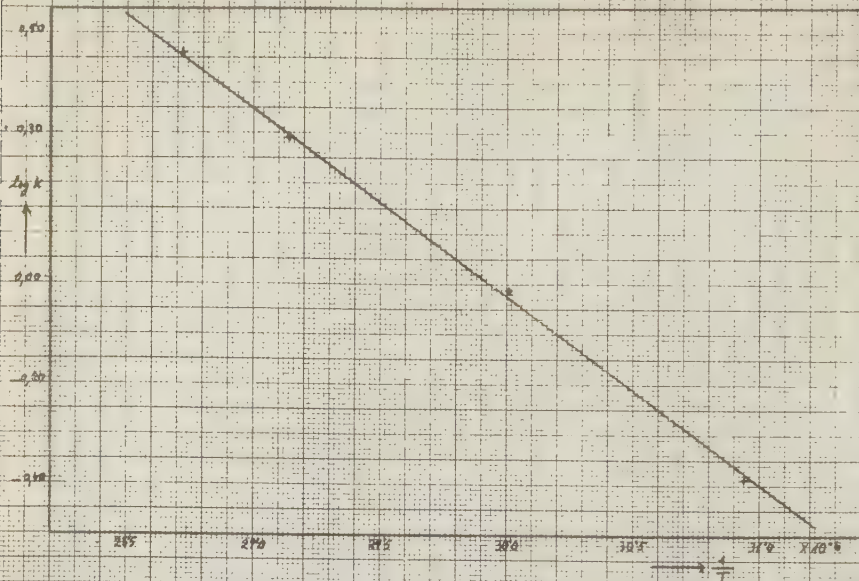
Hydrolyse des Alanin-Serins in 0,1 n NaOH



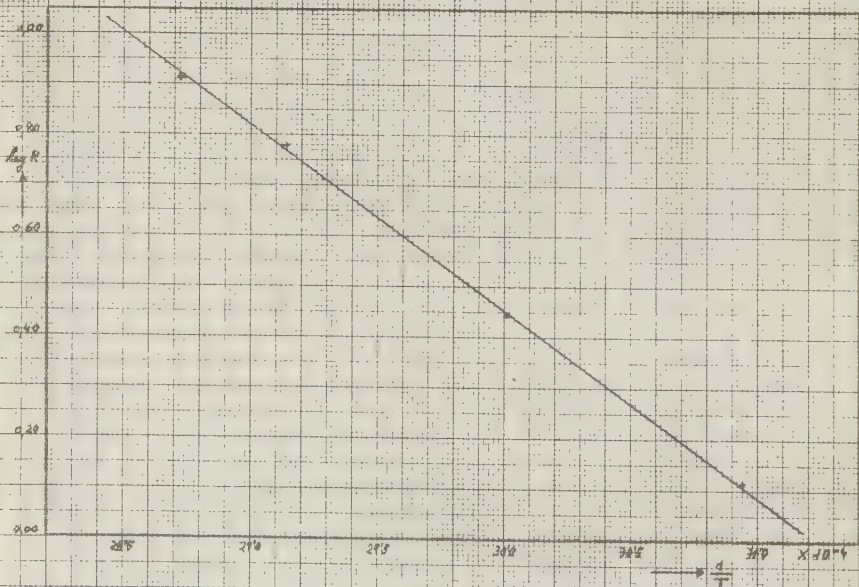
Hydrolyse des Alanyl-Serins in 0,2 n NaOH



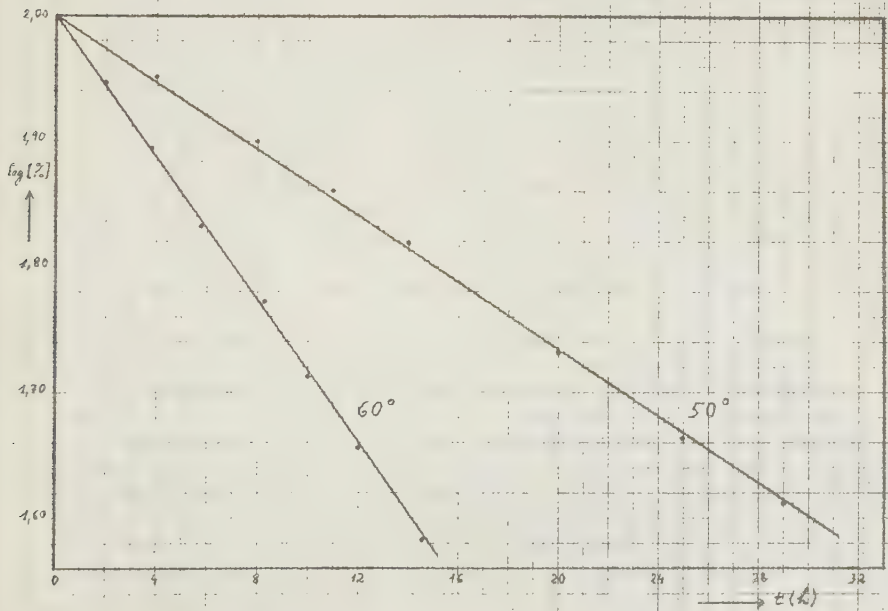
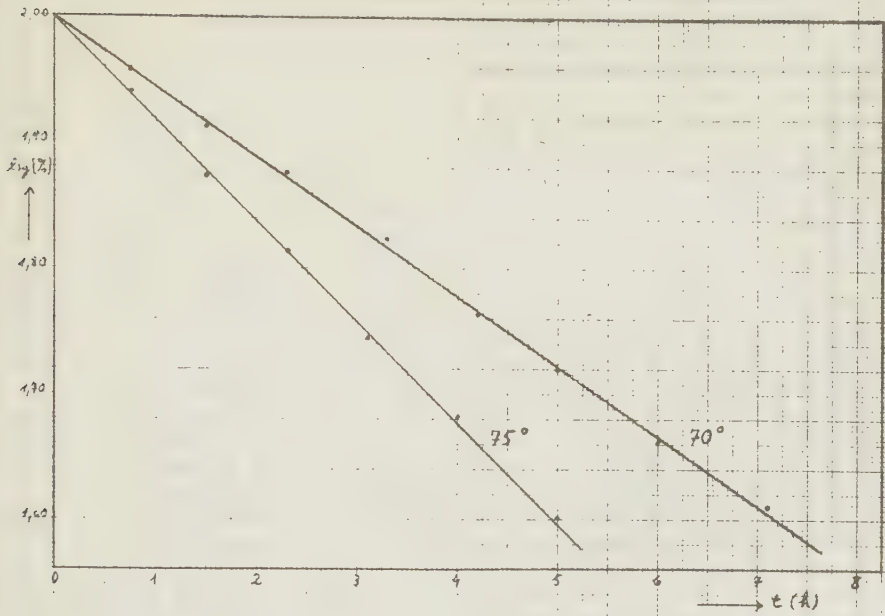
Arrheniusche Gerade für die Hydrolyse
des Alanin-Serins in 0,1 n NaOH



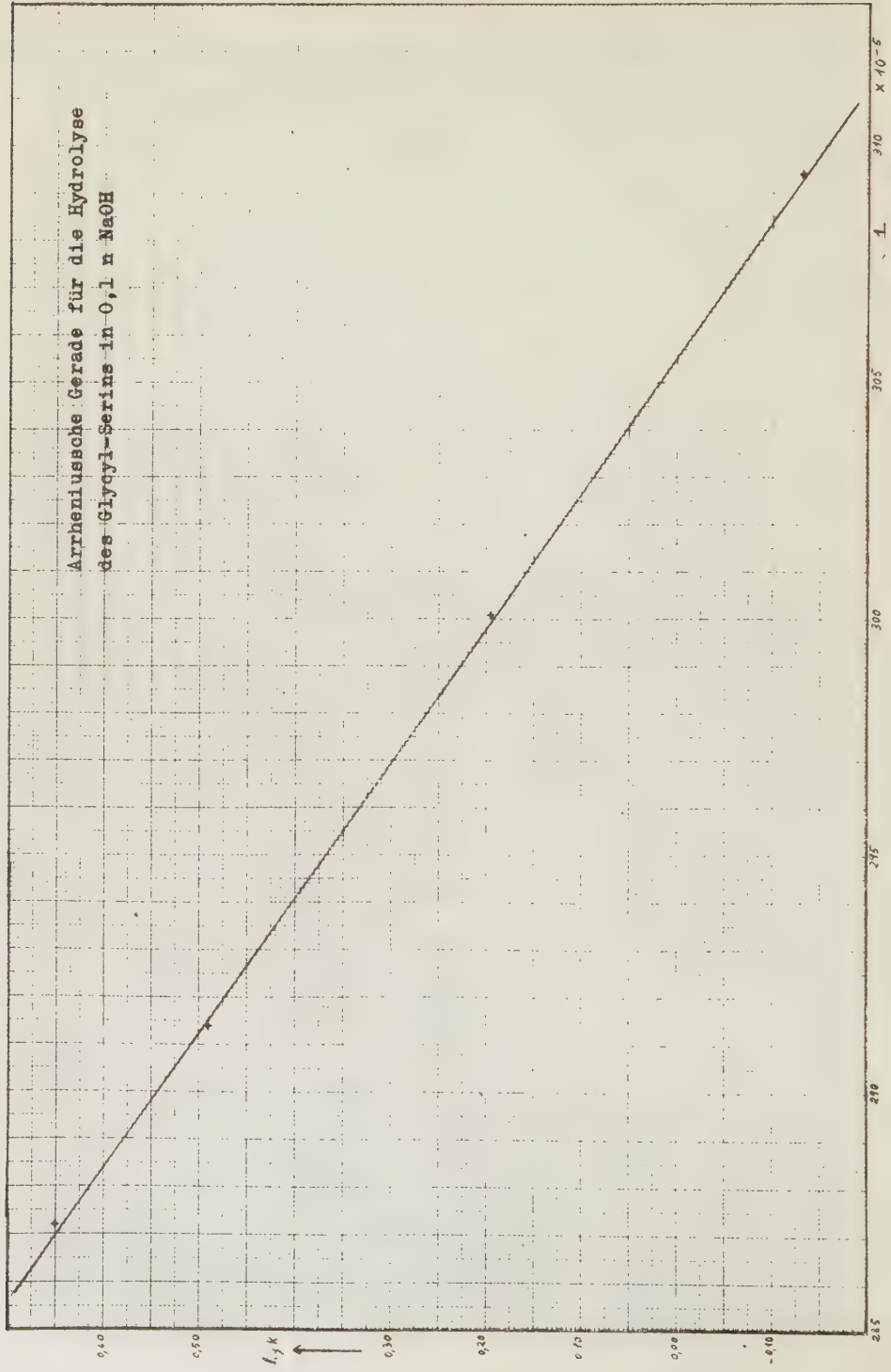
Arrheniusche Gerade für die Hydrolyse
des Alanin-Serins in 0,2 n NaOH

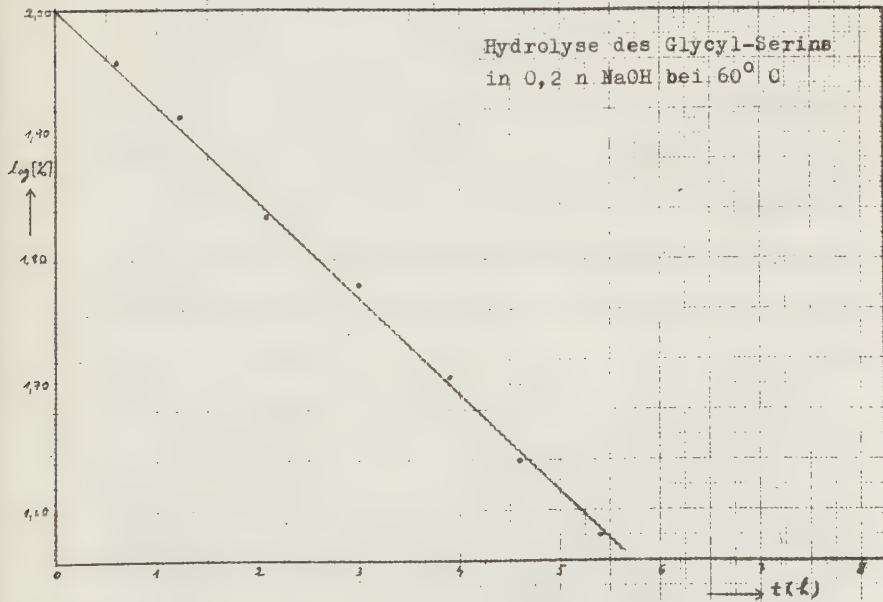
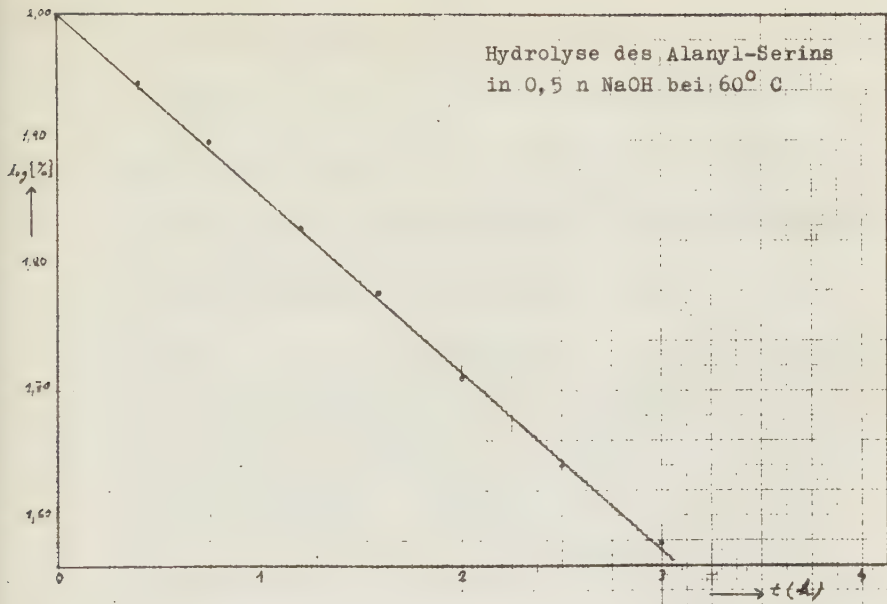


Hydrolyse des Glycyl-Serins in 0,1 n NaOH



Arrheniusche Gerade für die Hydrolyse
des Glycyl-Serins in 0,1 n NaOH





VIII. Diskussion der Versuchsergebnisse

Wie die Messergebnisse unserer kinetischen Versuche über die Spaltbarkeit von Serinpeptiden in neutralem Medium zeigen, ist eine der auffallendsten Eigenschaften der Serinpeptide die Schnelligkeit, mit der sie in Wasser gespalten werden. Im Gegensatz zu den anderen Peptiden, die in Wasser äusserst langsam hydrolysieren und nur in saurem oder alkalischem Medium in einem vernünftigen Zeitintervall gespalten werden, benötigen also die Serinpeptide für ihre Spaltung nicht die katalytische Wirkung einer Säure oder Base.

Vergleicht man die Werte der kinetischen Grössen, die wir bei der neutralen Hydrolyse des Alanyl-Serins und des Glycyl-Alanyl-Serins gewonnen haben, mit den Ergebnissen, die in unserem Institut bei der Spaltung in Wasser von nichtserinhaltigen Peptiden erhalten worden sind, so erkennt man deutlich die Sonderstellung, die die Serinpeptide innerhalb der Peptidreihe einnehmen.

Die von J. Fernandez ⁴⁶⁾ durchgeführten kinetischen Messungen der Hydrolyse des Glycyl-Alanins in reinem Wasser ergaben, dass z. B. bei 75° C erst nach ca. 4 Jahren die Halbwertszeit der Spaltung erreicht wird. Dagegen erhielten wir für die neutrale Hydrolyse des Alanyl-Serins und des Glycyl-Alanyl-Serins bei 75° C eine Halbwertszeit von 3,5 bzw. 1,9 Tagen. Die Vergleichswerte zeigen deutlich, dass die Serinpeptide durch eine besondere Reaktivität dem Wasser gegenüber gekennzeichnet sind.

Eine Erklärung dieses ungewöhnlichen Verhaltens der Serinpeptide in Wasser sehen wir in der nucleophilen Reaktivität der Hydroxigruppe des Serins gegenüber dem Carboxylkohlenstoffatom der Peptidbindung, denn z. B. die Peptide Glycyl-Alanin und Glycyl-Serin, die so verschiedene Spaltungsgeschwindigkeiten aufweisen, unterscheiden sich in ihrer Struktur nur durch eine OH-Gruppe.

Die Hydrolyse in reinem Wasser von Peptiden und strukturell analogen Verbindungen, wie z. B. Ester und Amide, ist bisher, im Gegensatz zu der Spaltung in saurem oder alkalischen Medium, kaum untersucht worden. Man weiss deshalb sehr wenig über den Chemismus des Reaktionsablaufs dieser Stoffe in wässriger Lösung.

Über den Mechanismus der hydrolytischen Spaltung der von uns untersuchten Serinpeptide kann man also nichts Definitives feststellen. Man kann aber zur Deutung der kinetischen Grössen, die wir bei unseren Peptiden erhalten haben, gewisse Mechanismen, die zur Erklärung des Reaktionsablaufs von normalen Peptiden postuliert worden sind, ausschliessen, und zwar auf Grund der Beobachtungen, die wir bei der chromatographischen und elektrophoretischen Trennung der Hydrolysatskomponenten unserer Peptide gemacht haben.

Die hydrolytische Spaltung des Alanyl-Serins und des Glycyl-Alanyl-Serins in Wasser geschieht praktisch ohne Nebenreaktionen. Dieses Verhalten ist dem der neutralen Hydrolyse von normalen Peptiden entgegengesetzt. So erfolgt z. B. die Spaltung des Glycyl-Alanins in Wasser ⁴⁶⁾

über die intermediäre Bildung des cyclischen Anhydrids eines Diketopiperazins:



Es findet also eine Wasserabspaltung (in Wasser!) sowie die Bildung einer neuen Peptidbindung (!) statt. Das ist überraschend, denn der Aufbau einer Peptidbindung ist präparativ sehr kompliziert. Die Bildungsgeschwindigkeit des Diketopiperazins ist viel grösser als die Geschwindigkeit, mit der sich das Ausgangspeptid direkt zu den Aminosäuren spaltet.

Eine ähnliche Erscheinung wurde von den Russen Poroschin und Kosarenko ⁵⁰⁾ bei der Spaltung des Glycyl-Alanins, Alanyl-Alanins und Prolyl-Glycins beobachtet. Diese Forscher, die den Reaktionsablauf chromatographisch verfolgten, stellten fest, dass die genannten Peptide die entsprechenden Diketopiperazine bilden, welche dann langsam wieder zu den Peptiden zurückspalten. Es findet auch dabei eine Inversion der Stellung der aufbauenden Aminosäuren statt. So fanden sie z. B., dass nach einiger Zeit neben dem Ausgangsstoff Prolyl-Glycin und dem Diketopiperazin auch Glycyl-Prolin vorhanden war. Das erklärt sich dadurch, dass bei dem gebildeten Diketopiperazin Pro-Gly die Spaltung an jeder seiner beiden Peptidbindungen stattfinden kann.

Wir hatten auch in unseren kinetischen Versuchen mit einer solchen Möglichkeit gerechnet. Wir suchten in den chromatographisch bzw. elektrophoretisch getrennten Hydrolysatkomponenten des Alanyl-Serins nach seinem Diketopiperazin

und dem invertierten Peptid Seryl-Alanin, ohne jedoch deren Vorhandensein feststellen zu können. Wenn diese Verbindungen sich während der Hydrolyse gebildet hätten, hätten wir es auf Grund ihrer Lage auf den Chromatogrammen und Pherogrammen beobachtet. Dies war nicht der Fall. In unseren Serinpeptiden war die intermediäre Bildung des Diketopiperazins (und somit des invertierten Di-peptids) nicht nachzuweisen. Es scheint uns daher berechnigt, anzunehmen, dass die Spaltung der Serinpeptide in neutralem Medium über einen anderen Mechanismus vor sich geht, als der für normale Peptide soeben geschilderte.

Ein Vergleich der Werte, die für die Aktivierungsenergien und Aktionskonstanten bei der hydrolytischen Spaltung der Serinpeptide in saurer, neutraler und alkalischer Lösung erhalten wurden, scheint uns aufschlussreich zu sein:

	E (kcal/M)	log A (d^{-1})
Ala-Ser in 1,0 n HCl ¹³⁾	23,0	14,2
Ala-Ser in 0,5 n HCl ¹³⁾	22,6	13,5
Gly-Ser in Wasser ¹³⁾	23,6	13,9
Ala-Ser in Wasser	23,2	13,9
Gly-Ala-Ser in Wasser	21,5	13,2
Gly-Ser in 0,1 n NaOH	16,1	10,8
Ala-Ser in 0,1 n NaOH	16,9	11,1
Ala-Ser in 0,2 n NaOH	16,7	11,4

Aus dieser Tabelle ist ersichtlich, dass die E-Werte der neutralen und sauren Hydrolyse der Serinpeptide in der selben Grössenordnung liegen, und dass sie ca. 7 kcal/Mol grösser als die E-Werte der alkalischen Spaltung sind. Ebenfalls sind die A-Werte der neutralen und sauren Hydrolyse für alle diese Peptide fast die gleichen, während die der alkalischen tausendmal kleiner sind.

Wir schliessen daraus, dass die neutrale Hydrolyse der Serinpeptide möglicherweise nach dem gleichen oder einem ähnlichen Mechanismus wie der der sauren Spaltung erfolgen kann.

Das beobachtete Zeitgesetz der Spaltung der Serinpeptide in Wasser entspricht dem einer Reaktion erster Ordnung bezüglich des Peptids. Dagegen kann man über die kinetische Ordnung des an der Reaktion beteiligten Wassers wegen der geringen Konzentrationsänderung keine Aussage machen. Aus dem Zeitgesetz kann man für den Übergangszustand folgende Bruttoformel ableiten:



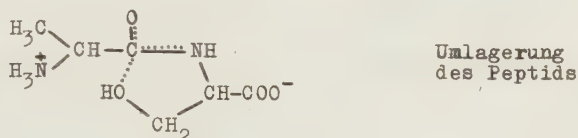
Für den Übergangszustand der Spaltung kann man zwei Strukturen formulieren, die der Tatsache Rechnung tragen, dass bei der Hydrolyse in wässriger Lösung sowohl das Wassermolekül als auch die Serinhydroxigruppe bei der Anlagerung an den Carbonylkohlenstoff konkurrieren können. Diese Strukturen entsprechen einerseits einer Umlagerung zu einem O-Peptid und andererseits der direkt verlaufenden Hydrolyse. Es ist bewiesen worden, dass bei beiden Prozessen der Carbonylkohlenstoff aus dem trigonalen in den tetragonalen Valenzzustand übergeht und dass die C-N-Bindung einen starken Doppelbindungscharakter besitzt.

Einer dieser zwei Mechanismen, der eventuell für die Spaltung der Serinpeptide in Wasser zuständig sein kann, wäre die Umlagerung des Peptids zu einem O-Peptid, welches dann zu den Aminosäuren spalten würde:

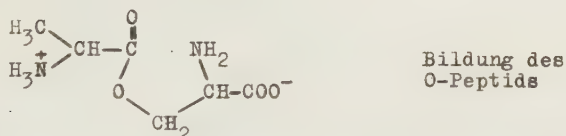


Dieser Mechanismus wurde von J. Heitberg für die saure Hydrolyse von Serinpeptiden vorgeschlagen, um die hohen Werte ihrer Aktivierungsenergien und Aktionskonstanten zu deuten.

Wenn für die neutrale Hydrolyse von Serinpeptiden dieser Mechanismus zutrifft, wäre folgende Struktur für den Übergangszustand der Umlagerung zu erwarten:



Diese Konfiguration würde dann in die des O-Peptids übergehen:

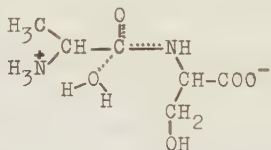


welches dann schnell zu den Aminosäuren spalten würde.

Dieser Mechanismus der intramolekularen $N \rightarrow O$ -Peptidwanderung, der auch die hohen E- und A-Werte für die Spaltung der Serinpeptide in neutralem Medium unter gewissen Annahmen erklären würde, scheint uns auf Grund anderer experimenteller Beobachtungen für die Spaltung in Wasser nicht zuständig zu sein. Denn die Untersuchungen der $N \rightarrow O$ -Peptidwanderung bei $pH \approx 6$ ergaben, dass nicht eine $N \rightarrow O$ -Peptidwanderung stattfindet, sondern umgekehrt eine $O \rightarrow N$ -Peptidwanderung. Nach sehr kurzer Zeit ist der Ausgangsstoff O-Peptid vollständig in das N-Peptid umgewandelt.

Basierend auf dieser Tatsache, nehmen wir an, dass die Spaltung der Serinpeptide zu den Aminosäuren nicht auf dem Reaktionsweg über die intermediäre Bildung des O-Peptids verläuft, sondern dass der Mechanismus ein solcher sein wird, nach dem das Peptid (über einen Übergangszustand, bei dessen Konfiguration das Wasser und die Serinhydroxigruppe sich beteiligen können) direkt zu den Aminosäuren spaltet.

Ein Übergangszustand der direkten Hydrolyse, bei dem das Wasser, aber nicht die Serinhydroxigruppe, teilnimmt:



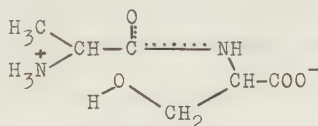
die zur Deutung des Mechanismus der Spaltung von nicht-serinhaltigen Peptiden in wässriger Lösung plausibel ist, kann zur Erklärung der schnellen Spaltung der Serinpeptide nicht angenommen werden. Der Grund hierfür ist, dass die Wirkung der OH-Gruppe des Serins bei der Hydrolyse offensichtlich eine grosse Rolle spielen muss, wie der Vergleich der k-Werte der Spaltung in Wasser der serinhaltigen und nichtserinhaltigen Peptide deutlich zeigt. Die schnelle Hydrolyse der Serinpeptide in Wasser ist also sicher auf die nucleophile Reaktionsfreudigkeit der Serinhydroxigruppe gegenüber dem Carbonylkohlenstoff der Peptidbindung zurückzuführen.

Wenn wir alle diese erwähnten Beobachtungen in Erwägung ziehen, scheint es uns, dass folgender Mechanismus für die Spaltung der Serinpeptide in Wasser zuständig sein

kann: Wir nehmen an, dass der Reaktionsmechanismus in einer direkten Spaltung der Peptide zu den Aminosäuren besteht und dass als Zwischenprodukt sich ein Übergangskomplex bildet, zu dessen Konfiguration sowohl die Serinhydroxigruppe als auch das Wassermolekül beitragen:



In einem ersten Schritt würde sich sofort eine ringförmige Anordnung bilden, welche dann das Wassermolekül angreifen und somit an der Spaltung der Peptidbindung mitwirken würde. Der primäre Reaktionsschritt soll also nicht unter Beteiligung des Wassers, sondern unter der der Serinhydroxigruppe stattfinden:



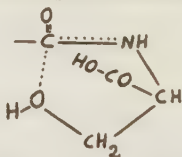
Als zweiter Schritt erfolgt die Anlagerung des Wassers. Dieser wäre der geschwindigkeitsbestimmende Schritt.

Dieser Mechanismus, der dem von Bergmann ⁵¹⁾ und Desnuelle ^{52,53)} für die Hydrolyse von Serinpeptiden in saurer Lösung vorgeschlagenen etwas ähnlich ist, gestattet eine Deutung der von uns erhaltenen kinetischen Grössen. Wie unsere Ergebnisse zeigen, zeichnen sich die Aktionskonstanten für die neutrale Hydrolyse der Serinpeptide durch einen hohen Wert aus. Dies bedingt, dass die Spaltung in Wasser trotz hoher Aktivierungsenergien schnell fortschreitet. Die von uns postulierte Konfiguration des Übergangskomplexes lässt die hohen Beträge der Aktionskonstanten erklären, denn diese Konformation des Peptids

begünstigt offensichtlich die Zusammenstösse zwischen dem Sauerstoffatom der Serinhydroxigruppe und dem Carbonylkohlenstoffatom der Peptidbindung.

Schliesslich sei auch erwähnt, dass nicht die Möglichkeit ausgeschlossen werden darf, dass die undissoziierte End-Carboxylgruppe des Serins auch an der Spaltung der Peptidbindung eine Rolle spielen kann 54).

Für unseren Fall könnte man dann annehmen, dass der Übergangszustand der Spaltung durch einen Komplex darzustellen wäre, bei dem die Serinhydroxigruppe mit dem Carbonylkohlenstoff der Peptidbindung einen flachen Ring bilden und dann, z. B. von oben her, die OH-Gruppe des undissoziierten Endcarboxyls an der Peptidbindung angreifen würde:



In neutralem pH-Bereich gibt es aber sehr wenige Peptidmoleküle mit undissoziierter End-Carboxylgruppe. Deshalb und auch wegen sterischer Gründe scheint uns dieser Mechanismus doch etwas künstlich zu sein.

Nachdem wir den Mechanismus der Spaltung der Serinpeptide in Wasser gedeutet zu haben glauben (denn die kinetischen Daten allein, obwohl so wichtig, gestatten nicht, den Chemismus eines Prozesses eindeutig zu erklären), wollen wir uns dem Reaktionsmechanismus in alkalischem Medium zuwenden.

Es sei hier schon vorweggenommen, dass die alkalische Hy-

drolyse der Serinpeptide sehr wahrscheinlich nach einem anderen Mechanismus als dem der neutralen vor sich geht, denn im Gegensatz zu der Spaltung in Wasser zeigen die Serinpeptide in alkalischem Medium kein ungewöhnliches Verhalten. Zwar werden sie hierin noch etwas schneller gespalten als die anderen Peptide (womit sich die aktivierende Wirkung der Serinhydroxigruppe auf die Peptidbindung doch etwas bemerkbar macht), aber die E- und A-Werte sind nicht mehr auffallend hoch, sondern normal. Die Arrheniusschen Grössen sind von der selben Grössenordnung wie die der nichtserinhaltigen Peptide.

Zuerst ersehen wir aus unseren Messergebnissen, dass die Spaltungsgeschwindigkeit r näherungsweise proportional der Basenkonzentration ist. Wir können also zunächst für das Zeitgesetz schreiben:

$$r \sim [p^-] [OH^-]$$

Wenn wir für die Reaktion folgenden Verlauf annehmen:



dann können wir nach der Theorie des Übergangszustandes die Reaktionsgeschwindigkeit ausdrücken durch:

$$r = k' [A] = k' \frac{a_A}{f_A}$$

Da nach dieser Theorie für die Gleichgewichtskonstante K des sich im Gleichgewicht mit den Reaktanten befindenden aktivierten Komplexes A gilt:

$$K = \frac{a_A}{a_{p^-} a_{OH^-} a_{H_2O}}$$

ergibt sich für die Reaktionsgeschwindigkeit:

$$r = k' K a_{p^-} a_{OH^-} a_{H_2O} / f_A$$

Da wir bei unseren Arbeitsbedingungen annehmen dürfen, dass die Aktivität des Wassers konstant bleibt, können wir sie mit in den Faktor $k'K$ einbeziehen:

$$r = k a_p a_{OH^-} / f_A = k [p^-] [OH^-] \frac{f_p f_{OH^-}}{f_A}$$

Es ergibt sich also, dass die Reaktionsgeschwindigkeit proportional der OH^- -Ionenkonzentration sein muss, solange der Faktor $f_p f_{OH^-} / f_A$ konstant bleibt.

Wie unsere Messergebnisse zeigen, besteht zwischen der Reaktionsgeschwindigkeit und der Basenkonzentration nur annähernd die geforderte Proportionalität. So z.B. beträgt die Halbwertszeit der Spaltung des Alanin-Serins bei $60^\circ C$ in 0,1n, 0,2n und 0,5n NaOH 16,9, 6 bzw. 2,1 Stunden.

Man sieht also, dass die Spaltungsgeschwindigkeit stärker zunimmt als der Zuwachs der OH^- -Konzentration theoretisch zulässt. Ähnliche Abweichungen wurden auch bei der sauren Peptidspaltung^{13,46)}, sowie bei der Esterhydrolyse beobachtet. Die Abweichung der Proportionalität zwischen den k -Werten und der OH^- -Konzentration kann darauf zurückgeführt werden, dass der Faktor $f_p f_{OH^-} / f_A$ wegen dem Einfluss, den die Änderung der Ionenstärke des Mediums auf die Aktivitätskoeffizienten ausübt, nicht konstant bleibt.

Die Aktivierungsenergie bleibt bei Verdoppelung der OH^- -Konzentration praktisch konstant; die Erhöhung der Ionenstärke scheint darauf wenig Einfluss zu haben. Die Aktionskonstante dagegen verdoppelt sich:

Ala-Ser in 0,1n NaOH	$E = 16,9 \text{ kcal/M}$	$A = 1,23 \cdot 10^{11} \text{ d}^{-1}$
Ala-Ser in 0,2n NaOH	$E = 16,7 \text{ kcal/M}$	$A = 2,40 \cdot 10^{11} \text{ d}^{-1}$

Die Erklärung dieser Beobachtungen ist, dass die Änderung der OH^- -Konzentration die Struktur des Übergangskomplexes nicht zu modifizieren vermag, denn dieser bildet sich aus den gleichen Reaktanten über den gleichen Reaktionsweg. Daher ändert sich kaum der Betrag E der zum Passieren des Energieberges notwendigen Energie. Andererseits, da bei Verdoppelung der OH^- -Konzentration sich die Möglichkeit der Zusammenstösse zwischen dem Peptidmolekül und den OH^- -Ionen verdoppelt, verdoppelt sich auch der A-Faktor; die Zahl der Stösse ist also der OH^- -Konzentration direkt proportional. Analoge Erscheinungen treten auch bei der sauren Hydrolyse ¹³⁾ auf.

Bei Beibehaltung der rechten Aminosäuren (Träger der Carboxylgruppe) und Änderung der linken (Träger der Aminogruppe) beobachtet man, dass die Vergrösserung der linken Substituenten die Geschwindigkeit der Spaltung verlangsamt. Das ist analog dem, was bei den nichtserinhaltigen Peptiden zu beobachten ist, wie aus folgender Zusammenstellung ersichtlich ist:

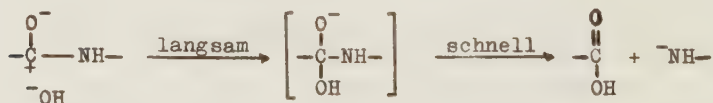
Hydrolyse verschiedener Peptide in 0,1 n NaOH

Glycyl-Serin	(50°)	$\tau = 22,6 \text{ h}$
Alanyl-Serin	(50°)	$\tau = 41,0 \text{ h}$
Glycyl-Alanin ¹²⁾	(50°)	$\tau = 5,5 \text{ d}$
Alanyl-Alanin ¹²⁾	(50°)	$\tau = 22 \text{ d}$
Alanyl-Glycin ¹²⁾	(67°)	$\tau = 1,6 \text{ d}$
Valyl-Glycin ¹²⁾	(67°)	$\tau = 120 \text{ d}$

Dieses Verhalten war zu erwarten, denn je mehr eine Annäherung der OH^- -Ionen an die Peptidbindung sterisch durch die zusätzliche Alkylgruppe behindert wird, desto langsamer wird die Spaltung vor sich gehen.

Nach dem, was man über die Mechanismen der Hydrolyse von Carbonsäurederivaten (Ester, Amide und Lactone) weiss, kommt für die Spaltung von Peptiden in alkalischem Medium von den drei möglichen Reaktionsmechanismen sehr wahrscheinlich nur der $B_{ac}2$ -Mechanismus in Frage. Das bedeutet nach der Nomenklatur von Ingold, dass die Reaktion in einem bimolekularen Prozess besteht, bei dem die Acylbindung gespalten wird und dass sie in basischem Medium abläuft. Dabei ist nur die OH-Ionenkatalyse berücksichtigt. Es gibt aber Hinweise für eine allgemeine Basenkatalyse der Ester, so dass auch bei den Peptiden diese Möglichkeit besteht.

Wegen der Ladungsverteilung der an der Peptidbindung beteiligten Atome ist verständlich, dass der Angriffspunkt des Hydroxidions der Carbonylkohlenstoff sein wird, denn dieser besitzt eine positive Ladung. Die OH-Ionen erleichtern die Aufrichtung der Carbonylgruppe und damit die Bildung eines aktivierten Komplexes. Das OH-Ion wird von dem positiven Kohlenstoff angezogen und an diesen angelagert, wobei sich der Übergangskomplex bildet:



Die Anlagerung des OH-Ions ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Danach erfolgt die schnelle Trennung der NH^- -Gruppe, welche dann in einem zweiten Schritt mit dem Wasser unter Abgabe eines Protons reagiert. Der ganze Prozess ist eine bimolekulare nucleophile Substitution.

Dieser Mechanismus, der analog den Mechanismen ist, die für die alkalische Hydrolyse von Estern und Amiden postu-

liert sind, steht im Einklang mit dem beobachteten Zeitgesetz. Ausserdem sind die Aktionskonstanten der alkalischen Hydrolyse unserer Peptide von der gleichen Grössenordnung wie die der Esterhydrolyse.

Man könnte auch annehmen, dass die Anlagerung des OH-Ions und des Wassers nicht nacheinander, sondern gleichzeitig erfolgt. Ob es sich um einen trimolekularen Prozess handelt oder nicht, könnte eventuell entschieden werden, wenn man die Kinetik der Spaltung in einem inerten Lösungsmittel untersuchte, in dem das Wasser nur als Reaktant zugegen wäre.

Die verschiedenen kinetischen Grössen der bauungleichen Serinpeptide sind auf die verschiedenen sterischen und induktiven Effekte der angehängten Radikalen zurückzuführen.

Wie sehen z.B., dass das Glycyl-Serin schneller gespalten wird als das Alanyl-Serin. Die Ursachen dafür sind drei: Erstens ist die innermolekulare DK des Alanyl-Serins durch dessen etwas komplizierten Bau schwächer als die des Glycyl-Serins, wodurch die deaktivierende Wirkung, die die negativ geladene End-Carboxylgruppe auf den CO-Kohlenstoff der Peptidbindung ausübt, verstärkt wird.

Zweitens übt die in dem Alanyl-Serin zusätzlich auftretende Methylgruppe einen stärkeren Elektronendruck auf den CO-Kohlenstoff der Peptidbindung aus, wodurch diese stärker als bei dem Glycyl-Serin deaktiviert wird.

Drittens kann die zusätzliche Methylgruppe des Alanyl-Serins durch teilweise Abschirmung der Peptidbindung den Angriff des OH-Ions sterisch behindern.

Die zwei ersten Effekte führen zu einer Desaktivierung des

Carbonylkohlenstoffs, der dritte wirkt einfach hindernd. Alle drei Effekte wirken in der gleichen Richtung: Verminderung der Spaltungsgeschwindigkeit des Alanin-Serins im Vergleich zu der des Glycyl-Serins.

Man muss auch bedenken, dass die negative Ladung der End-Carboxylgruppe des in alkalischem Medium vorliegenden Peptidanions elektrostatisch abstossend auf die OH-Ionen wirkt, wodurch deren Annäherung an das Peptid erschwert wird.

Je näher die End-Carboxylgruppe an der Peptidbindung liegt, desto langsamer wird die Spaltung erfolgen. Da aber in unseren Peptiden die Peptidbindung gleich weit entfernt von der COO^- -Gruppe liegt, ist die abstossende Wirkung dieser Gruppe die gleiche bei beiden Peptiden, so dass die Unterschiede der kinetischen Grössen nicht den Unterschieden in diesem Effekt zuzuschreiben sind.

Zusammenfassend kann gesagt werden:

Die alkalische Hydrolyse verläuft schneller als die neutrale und saure.

Die Spaltungsgeschwindigkeit ist der OH-Ionenkonzentration annähernd proportional und fast unabhängig von der Stärke der verwendeten Base.

Mit zunehmender Grösse der Radikalen wachsen der Elektronendruck und die sterische Hinderung, während die innermolekulare DK absinkt. Als Folge dieser Effekte erhöht sich die Aktivierungsenergie des Prozesses und daher verlangsamt sich die Spaltung.

IX. Zusammenfassung

Einige mit C-14 markierte serinhaltige Di- und Tripeptide wurden synthetisiert und der Spaltung in neutralem und alkalischem Medium bei verschiedenen Temperaturen ausgesetzt. Die in angemessenen Zeitabständen anfallenden Hydrolysate wurden chromatographisch oder elektrophoretisch getrennt und die Konzentration der getrennten Bestandteile auf Grund ihrer Radioaktivität quantitativ bestimmt.

Methoden und Bedingungen der Synthesen, der chromatographischen und elektrophoretischen Arbeiten und der Aktivitätsbestimmungen wurden angegeben.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Hydrolyse unter den gegebenen Bedingungen nach einem Zeitgesetz erster Ordnung verläuft. Die entsprechenden Halbwertszeiten der Spaltung wurden graphisch ermittelt und daraus die Geschwindigkeitskonstanten berechnet. Aus den bei verschiedenen Temperaturen erhaltenen k-Werten wurden die Arrheniusschen Geraden ermittelt und die Aktivierungsenergien und Aktionskonstanten berechnet.

Die erhaltenen kinetischen Daten der Spaltung in Wasser zeigen, dass die neutrale Hydrolyse der Serinpeptide ausserordentlich rasch erfolgt. Die entsprechenden E- und A-Werte sind auch auffallend hoch. Es wurde ein Mechanismus diskutiert, nach dem die Spaltung über einen Übergangskomplex verläuft, bei dessen Bildung die OH-Gruppe des Serins und das Wassermolekül teilnehmen.

Die Spaltung der Serinpeptide verläuft auch in alkalischem

Medium etwas schneller als die der normalen Peptide. Jedoch zeigen die Serinpeptide unter diesen Bedingungen, im Gegensatz zu der Spaltung in Wasser, kein aussergewöhnliches Verhalten. Die erhaltenen E- und A-Werte sind hier von der selben Grössenordnung wie die der alkalischen Hydrolyse von normalen Peptiden. Es besteht eine Proportionalität zwischen der Reaktionsgeschwindigkeit und der Hydroxidionenkonzentration.

Die Spaltung verläuft nach einem sog. $B_{ac}2$ -Mechanismus. Der erste und geschwindigkeitsbestimmende Schritt besteht in der Anlagerung des OH^- -Ions an die Carbonylgruppe der Peptidbindung, während das Wasser erst in einem zweiten Schritt mit dem abgetrennten NH^- -Rest reagiert. Die verschiedenen Aktivierungsenergien der bauungleichen Peptiden deuten sich durch die verschiedenen sterischen und induktiven Effekte der an der Peptidbindung beteiligten Gruppen.

Wegen des ungewöhnlichen Verhaltens der Serinpeptide dem Wasser gegenüber kann man erwarten, dass die Spaltung von Proteinen, in deren Peptidbindungen das Serin teilnimmt, sehr schnell in Wasser erfolgen wird.

A n h a n g

(Aktivitätsmesswerte)

Hydrolyse des Alanin-Serins in reinem Wasser

	Zeit h	Alanin ipm	Ala-Ser ipm	Gesamtakt. ipm	% Ala-Ser	% Ala-Ser Mittelwert
75°	0	20	8630	8650	99,8	99,8
	8,3	625	7520	8145	92,7	93,3
	8,3	540	8265	8805	93,9	
	22	1385	6265	7650	83,2	83,2
	34	1780	5200	6980	74,5	76,1
	34	1805	6305	8110	77,7	
	51	2420	4865	7285	66,8	65,3
	51	2815	4985	7805	63,9	
	62	2880	4285	7165	59,8	59,8
	74	3070	3725	6795	54,8	54,3
	74	3660	4270	7930	53,8	
	88	4115	4005	8120	49,3	49,1
88	4135	3970	8105	49,0		
=====						
70°	0	20	8630	8650	99,8	99,8
	8,3	385	8815	9200	95,8	95,4
	8,3	430	8145	8575	95,0	
	24	890	7425	8315	89,3	88,1
	24	1085	7215	8300	86,9	
	48	1785	6765	8550	79,1	79,4
	48	1770	6955	8725	79,7	
	66	2415	6295	8710	72,3	72,3
	88	2865	5020	7885	63,7	63,8
	88	3010	5310	8320	63,8	
	118	3245	4385	7630	57,5	56,1
	118	3210	3870	7080	54,7	
	144	4300	4130	8430	49,0	48,2
	144	4515	4055	8570	47,3	
	215	5455	2315	7770	29,8	30,5
	215	5575	2540	8115	31,3	

Hydrolyse des Alanyl-Serins in reinem Wasser

	Zeit h	Alanin ipm	Ala-Ser ipm	Gesamtakt. ipm	% Ala-Ser	% Ala-Ser Mittelwert
60°	0	---	---	---	100	100
	47	460	5290	5750 E	92,0	92,3
	47	410	5095	5505 C	92,6	
	96	930	4910	5840 E	84,1	83,0
	96	950	4320	5270 C	82,0	
	143	1245	4310	5555 E	77,6	77,8
	143	1140	4045	5185 C	78,0	
	190	1570	3740	5310 E	70,4	69,0
	190	1710	3560	5270 C	67,5	
	240	1885	3295	5180 E	63,6	63,7
	240	1845	3250	5095 C	63,8	
	314	2330	2890	5220 E	55,4	55,7
	314	2315	2940	5255 C	56,0	
	396	2680	2450	5130 C	47,8	47,8
	651	3480	1420	4900 E	29,0	29,0

50°	0	---	---	---	100	100
	72	285	5605	5890 E	95,2	95,3
	72	260	5340	5600 C	95,4	
	143	510	4625	5135 E	90,1	91,2
	143	415	5005	5420 C	92,3	
	216	690	4895	5585 E	87,7	87,5
	216	715	4910	5625 C	87,3	
	312	845	4125	4970 E	83,0	83,4
	312	855	4375	5230 C	83,7	
	456	1325	3980	5305 E	75,0	75,0
	624	1625	3600	5225 C	68,9	68,9
	768	2190	3830	6020 E	63,6	63,5
	768	1835	3175	5010 C	63,4	
	912	2170	2975	5145 E	57,8	57,8
	1056	2335	2745	5080 E	54,0	53,2
	1056	2310	2540	4850 C	52,4	

Hydrolyse des Glycyl-Alanyl-Serins in reinem Wasser

	Zeit h	Gly-Ala ipm	Gly-Ala-Ser ipm	Gesamtakt. ipm	Gly-Ala-Ser %
75°	0	25	4840	4865	99,5
	8	590	4540	5130	88,5
	12	815	3475	4290	83,4
	21	1215	3420	4635	73,8
	32	1790	2825	4615	61,2
	40	2200	2670	4870	54,8
	48	2190	1995	4185	47,7
	61	2455	1655	4110	40,3
=====					
70°	0	25	4840	4865	99,5
	8	385	4395	4780	92,0
	21	840	3690	4530	81,5
	32	1345	3560	4905	72,6
	48	1620	2660	4280	62,2
	66	2045	2255	4300	52,5
	81	2315	1975	4290	46,1
=====					
60°	0	25	4840	4865	99,5
	12	225	4585	4810	95,3
	30	520	4325	4845	89,3
	60	1015	3745	4760	78,7
	98	1535	3445	4980	69,2
	129	1890	3035	4925	61,6
	168	2015	2240	4255	52,6

Hydrolyse des Alanyl-Serins in 0,1 n NaOH

	Zeit h	Alanin ipm	Ala-Ser ipm	Gesamtakt. ipm	% Ala-Ser	% Ala-Ser Mittelwert
75°	0	40	6980	7020	99,5	99,5
	1,5	1155	5285	6440	82,1	82,8
	1,5	1125	5700	6825	83,5	
	2,7	1740	4390	6130	71,7	71,6
	2,7	1785	4470	6255	71,5	
	3,4	2195	3910	6105	64,1	65,1
	3,4	2215	4315	6530	66,1	
	4,1	2620	4610	7230	63,7	62,4
	4,1	2775	4360	7135	61,1	
	5,2	3155	4030	7185	56,0	54,9
	5,2	3100	3610	6710	53,8	
	6,2	3620	3230	6850	48,2	48,5
	6,2	3550	3385	6935	48,8	
	7,3	4155	2885	7040	40,1	41,6
	7,3	3775	2845	6620	43,0	
	9,0	4215	2240	6455	34,7	34,7
=====						
70°	0	35	7185	7220 C	99,6	99,6
	2	1050	6050	7100 C	85,2	85,6
	2	1015	6230	7245 E	86,0	
	4	1900	5205	7105 E	73,3	73,3
	6	2945	4770	7715 C	61,8	62,0
	6	2610	4280	6890 E	62,1	
	8	3380	3550	6930 C	51,2	51,4
	8	3390	3625	7015 E	51,7	
	10	4195	3225	7420 C	43,5	44,8
	10	3820	3270	7090 E	46,1	
	12	3905	2470	6375 C	38,8	38,8
	12	4015	2535	6550 C	38,7	
	20	5360	1380	6740 C	20,5	20,1
	20	5635	1375	7010 E	19,6	
	48	6260	205	6465 C	3,2	3,4
	48	6335	245	6580 C	3,7	

Hydrolyse des Alanyl-Serins in 0,1 n NaOH

	Zeit h	Alanin ipm	Ala-Ser ipm	Gesamtakt. ipm	% Ala-Ser	% Ala-Ser Mittelwert
60°	0	70	7110	7180	99,2	99,2
	3	980	6120	7100	86,2	86,5
	3	955	6285	7240	86,8	
	6	1835	5260	7095	74,1	76,5
	6	1515	5305	6820	77,8	
	9	2230	4765	6995	68,1	68,2
	9	2100	4510	6610	68,2	
	12	2675	4530	7205	62,5	61,9
	12	2530	4015	6545	61,3	
	19	3285	3030	6315	48,0	46,9
	19	3790	3190	6980	45,7	
	23	3940	2555	6495	39,3	39,8
	23	4190	2820	7010	40,2	
	32	4990	1890	6880	27,5	28,1
	32	4660	1910	6570	28,9	
	48	5740	975	6725	14,5	14,5
=====						
50°	0	55	7880	7935	99,5	99,5
	7,5	1005	6655	7660	87,0	88,3
	7,5	845	7185	8030	89,5	
	12	1345	6130	7475	82,0	82,0
	20	2280	5600	7880	71,1	70,8
	20	2120	5070	7190	70,5	
	25,8	2720	5050	7770	64,9	64,5
	25,8	2460	4390	6850	64,1	
	30	3010	4295	7305	58,8	61,2
	30	2600	4570	7170	63,7	
	39	3785	4135	7920	52,2	52,2
	39	3570	3895	7465	52,2	
	49,5	3375	2685	6060	44,3	43,2
	49,5	3995	2905	6900	42,1	
	72,5	5190	2150	7340	29,7	31,8
	72,5	5350	2765	8115	34,0	
	78,2	5245	2300	7545	30,5	30,5
	91	5535	1755	7290	24,1	24,1
	127	6285	830	7115	11,7	11,7

Hydrolyse des Alanyl-Serins in 0,2 n NaOH

	Zeit h	Alanin ipm	Ala-Ser. ipm	Gesamtakt. ipm	% Ala-Ser	% Ala-Ser Mittelwert
75°	0	20	5615	5635	99,7	99,7
	0,5	910	4470	5680	84,0	84,3
	0,5	835	4585	5420	84,6	
	0,8	1175	3750	4925	76,1	76,7
	0,8	1210	4100	5310	77,2	
	1,3	1875	3420	5295	64,6	63,7
	1,3	2050	3455	5505	62,8	
	1,8	2440	2900	5340	54,3	54,9
	1,8	2445	3040	5485	55,4	
	2,1	2405	2570	4975	51,7	49,4
	2,1	2725	2425	5150	47,1	
	2,6	3030	2170	5200	41,7	41,3
	2,6	2990	2060	5050	40,8	
	3,3	3440	1620	5060	32,0	32,2
	3,3	3700	1770	5470	32,4	
	3,8	4120	1760	5880	29,9	29,9
	4,0	3985	1345	5330	25,2	25,2
	5,0	4245	920	5165	17,8	17,8
=====						
70°	0	25	4630	4655	99,5	99,5
	0,5	455	3805	4260	89,3	88,8
	0,5	515	3925	4440	88,4	
	1,0	955	3535	4490	78,7	78,1
	1,0	1025	3505	4530	77,4	
	1,5	1500	2780	4280	67,1	68,4
	1,5	1350	3085	4435	69,6	
	2,1	1720	2600	4320	60,2	59,7
	2,1	1690	2455	4145	59,2	
	2,7	2195	2330	4525	51,5	51,5
	3,3	2475	2020	4495	44,9	44,6
	3,3	2290	1820	4110	44,3	
	3,8	2615	1705	4320	39,4	38,6
	3,8	3060	1860	4920	37,8	
	4,7	3505	1750	5255	33,3	31,7
	4,7	3370	1460	4830	30,2	
	5,5	3735	1130	4865	23,2	24,1
	5,5	3560	1180	4740	24,9	

Hydrolyse des Alaninyl-Serins in 0,2 n NaOH

	Zeit h	Alanin ipm	Ala-Ser ipm	Gesamtakt. ipm	% Ala-Ser	% Ala-Ser Mittelwert
60°	0	25	6170	6195	99,6	99,6
	1,2	765	5350	6115	87,5	87,3
	1,2	775	5230	6005	87,1	
	2,4	1490	4710	6200	76,0	76,4
	2,4	1390	4580	5970	76,9	
	3,6	1905	3815	5720	66,7	66,7
	4,8	2365	3480	5845	59,5	58,6
	4,8	2540	3425	5965	57,6	
	5,6	2895	3135	6030	52,0	52,0
	7,0	3315	2405	5720	42,0	43,9
	7,0	3155	2665	5820	45,8	
	8,4	3905	2405	6310	38,1	38,7
	8,4	3640	2345	5985	39,2	
	9,6	4170	2020	6190	32,6	32,6
	11,6	4725	970	5695	17,0	15,1
	11,6	5035	765	5800	13,2	
	19,5	4975	600	5575	10,8	10,8
	25,0	5490	330	5820	5,7	5,7
=====						
50°	0	30	6640	6670	99,6	99,6
	1,8	605	6085	6690	91,0	91,0
	3,4	990	5830	6820	85,5	84,0
	3,4	1120	5325	6445	82,6	
	5,6	1685	4595	6280	73,2	74,5
	5,6	1580	4920	6500	75,7	
	7,7	2245	4280	6525	65,6	65,6
	7,7	2230	4230	6460	65,5	
	10,1	2620	3550	6170	57,5	57,5
	11,9	2895	3540	6435	55,0	53,1
	11,9	2970	3105	6075	51,1	
	14,0	3490	3120	6610	47,2	47,8
	14,0	3310	3100	6410	48,4	
	21,0	4215	1865	6080	30,7	30,7
	36,0	5515	900	6415	14,0	14,0
	52,0	5740	385	6125	6,3	6,3

Hydrolyse des Glycyl-Serins in 0,1 n NaOH

	Zeit h	Glycin ipm	Gly-Ser ipm	Gesamtakt. ipm	Gly-Ser %	% Gly-Ser Mittelwert
75°	0	20	6045	6065 E	99,7	99,7
	0,75	715	5190	5905 E	87,9	87,1
	0,75	820	5140	5960 C	86,3	
	1,5	1385	4535	5920 E	76,6	74,6
	1,5	1520	3990	5510 C	72,5	
	2,3	2005	3625	5630 E	64,4	65,1
	2,3	1965	3780	5745 C	65,8	
	3,1	2545	3215	5760 C	55,8	55,4
	3,1	2645	3230	5875 C	55,0	
	4,0	3050	2860	5910 C	49,2	48,1
	4,0	3005	2680	5685 C	47,1	
	5,0	3535	2235	5770 E	38,7	39,9
	5,0	3295	2295	5590 C	41,1	
	5,9	3985	1925	5910 C	32,6	32,6
	6,6	4265	1860	6125 E	30,4	30,1
	6,6	4035	1710	5745 C	29,8	
	9,5	4655	975	5630 E	17,3	17,3
70°	0	20	5560	5580 E	99,6	99,6
	0,75	540	4875	5415 E	90,0	90,9
	0,75	455	4995	5450 C	91,7	
	1,5	1005	4555	5560 E	81,9	81,9
	2,3	1195	3505	4700 E	74,6	75,2
	2,3	1270	3970	5240 E	75,8	
	3,3	1805	3580	5385 E	66,5	66,5
	4,2	2105	2965	5070 C	58,5	57,8
	4,2	2200	2925	5125 E	57,1	
	5,0	2875	3095	5970 E	51,8	52,5
	5,0	2595	2950	5545 C	53,2	
	6,0	3010	2700	5710 E	47,3	45,9
	6,0	3450	2755	6205 C	44,4	
	7,1	3060	2060	5120 E	40,2	40,8
	7,1	3040	2145	5185 C	41,4	
	8,5	3540	1905	5445 E	35,0	33,2
	8,5	3645	1675	5320 C	31,5	
	10,2	3515	1465	4980 E	29,4	29,4
	11,5	3870	1345	5215 C	25,8	25,8

Hydrolyse des Glycyl-Serins in 0,1 n NaOH

	Zeit h	Glycin ipm	Gly-Ser ipm	Gesamtakt. ipm	Gly-Ser %	% Gly-Ser Mittelwert
60°	0	25	6355	6380 C	99,6	99,6
	2,0	755	5745	6500 E	88,4	88,3
	2,0	730	5465	6195 C	88,2	
	3,8	1375	5050	6425 E	78,6	78,2
	3,8	1405	4920	6325 C	77,8	
	5,8	2040	4130	6170 E	66,9	67,8
	5,8	2010	4405	6415 C	68,7	
	8,3	2490	3440	5930 E	58,0	59,3
	8,3	2465	3775	6240 C	60,5	
	10	3150	3360	6510 E	51,6	51,4
	10	2970	3115	6085 C	51,2	
	12	3370	2855	6225 E	45,9	45,4
	12	3530	2870	6400 C	45,0	
	14,6	4085	2325	6410 C	36,3	38,2
	14,6	3605	2415	6020 C	40,1	
	26	4990	1140	6130 C	18,6	18,6
	47	6105	380	6485 C	5,9	5,9
=====						
50°	0	25	6790	6815 C	99,7	99,7
	4	675	6125	6800 E	90,1	89,6
	4	840	5890	6730 C	89,0	
	8	1490	5335	6825 E	78,2	79,4
	8	1265	5250	6515 C	80,6	
	11	1920	4980	6900 E	72,2	72,5
	11	1815	4850	6665 C	72,8	
	14	2195	4245	6440 C	65,9	65,9
	20	3000	3745	6745 E	55,5	53,8
	20	3330	3610	6940 C	52,0	
	25	3455	2980	6435 E	46,3	46,0
	25	3650	3060	6710 C	45,6	
	29	4220	2675	6895 E	38,8	40,9
	29	3745	2810	6555 C	43,0	
	39	4760	2120	6880 E	30,8	30,8
	46	4960	1565	6525 C	24,0	24,0
	56	5495	1155	6650 C	17,4	17,4

Hydrolyse des Alanyl-Serins in 0,5 n NaOH

	Zeit h	Alanin ipm	Ala-Ser ipm	Gesamtakt. ipm	Ala-Ser %
60°	0	20	5535	5555	99,6
	0,4	675	4885	5560	87,9
	0,75	1095	4140	5235	79,1
	1,2	1725	3660	5385	68,0
	1,6	2010	3030	5040	60,1
	2,0	2515	2655	5170	51,4
	2,5	2935	2265	5200	43,6
	3,0	3235	1975	5210	37,9
	4,5	3915	1200	5155	23,5
	8,0	4695	385	5080	7,6

Hydrolyse des Glycyl-Serins in 0,2 n NaOH

	Zeit h	Glycin ipm	Gly-Ser ipm	Gesamtakt. ipm	Gly-Ser %
60°	0	35	7160	7195 E	99,5
	0,7	355	6465	6820	94,8
	1,2	1220	5520	6740	81,9
	2,1	2185	4680	6865	68,2
	3,0	2590	4415	7005 E	60,3
	3,9	3190	3295	6485	50,8
	4,6	3670	2850	6520	43,7
	5,4	4065	2490	6555	38,0
	7,5	4805	1625	6430	25,3
	8,2	5055	1415	6470	21,9

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

- 1) P.A. Levene, J. Biol. Chem. 61, 445 (1924)
H.S. Simms,
M.H. Pfaltz
- 2) E. Abderhalden, Zeitschr. f. phys. Chem. 170, 146 (1927)
H. Brockmann
- 3) W. Kuhn Chemische Berichte 65, 1179 (1932)
- 4) P.A. Levene, J. Biol. Chem. 82 (1929)
R.E. Steiger
- 5) R.L.M. Synge Biochemical Journal 39, 351 (1945)
- 6) L. Lawrence, J. Am. Chem. Soc. 73, 3973 (1951)
W.J. Moore
- 7) E.F. Hammel, J. Am. Chem. Soc. 76, 3741 (1954)
S. Gladstone
- 8) R. Hirohata Zeitschr. f. physiol. Che. 295, 368 (1953)
- 9) S.J. Leach, Transact. of Faraday Soc. 49, 921 (1953)
H. Lindley
- 10) J. Chouteau Annales de la Fac. de
Sciences de Marseille Bd. 23 (1954)
- 11) H. Jung Dissertation, Frankfurt/M (1958)
- 12) J. Heintges Inaugural-Dissertation,
Frankfurt/M (1959)
- 13) J. Heigberg Inaugural-Dissertation
Frankfurt/M (1961)
- 14) H. Jung Diplomarbeit, Frankfurt/M (1957)
- 15) H. Heintges Diplomarbeit, Frankfurt/M (1957)
- 16) Th. Wieland, Liebigs Ann. Chem. 572, 190 (1951)
H. Bernhard
- 17) M. Bergmann, Berichte 65, 1192 (1932)
L. Zervas
- 18) Organic Synthesis III, 167 (1955)
- 19) H.K. Miller, J. of Am. Chem. Soc. 74, 1092 (1952)
H. Waelsch
- 20) B.F. Erlanger, J. of Am. Chem. Soc. 73, 3508 (1951)
E. Brand,
H. Sachs

21)	D.Ben-Ishai, A.Berger	J. of Org. Chemistry	17,1564	(1952)
22)	Th.Wieland, B.Heinke	Liebigs Ann. Chem.	615,196	(1958)
23)	Houben-Weyl	Methoden der org.Chem.	III,865	(1923)
24)	J.Heidberg	Diplomarbeit, Frankfurt		(1959)
25)	F.Cramer	Papierchromatographie	5.Aufl.	(1962)
26)	F.Turba	Chromatogr.Methoden in der Proteinchemie		(1954)
27)	R.Consden, A.H.Gordon, A.J.P.Martin	Biochemical Journal	38,224	(1944)
28)	H.H.Strain	Analyt. Chem.	23,26	(1951)
29)	A.J.P.Martin, R.L.M.Synge	Biochemical Journal	35,1358	(1941)
30)	A.Grüne	Papierchromatographie (Schleicher & Schüll)		(1955)
31)	L.Fowden, I.R.Penney	Nature	165,846	(1950)
32)	A.J.P.Martin, R.L.M.Synge	Adv. Prot. Chem.	2,31	(1945)
33)	H.G.Kunkel, A.Tiselius	J. Gen. Physiol.	35,89	(1951)
34)	A.Tiselius	Handbuch der biolog. Arbeitsmethoden	S.645	(1929)
35)	T.B.Coolidge	J. of Biol. Chem.	127,551	(1939)
36)	J.A.V.Butler, J.M.L.Stephen	Nature (London)	160,469	(1947)
37)	Th.Wieland, E.Fischer	Naturwissenschaft	35,29	(1948)
38)	E.L.Durrum	J.Am.Chem.Soc.	72,2943	(1950)
39)	F.Turba, H.J.Enenkel	Naturwissenschaft	37,93	(1950)
40)	H.Michl	Mh. Chem. Mh. Chem.	82,489 83,743	(1951) (1952)
41)	N.Getoff	Kurzes Radiochemi- sches Praktikum		(1961)

- | | | | | |
|-----|--|--|---------|--------|
| 42) | Herforth-Koch | Radiophysik. und Radiochem. Grundpraktikum | | (1962) |
| 43) | Aus Beschreibung des 2π -Zählrores FH 512
Frieske & Hoepner, Erlangen-Bruck | | | (1957) |
| 44) | R.A.Faires,
B.H.Parks | Arbeitsmethoden im Radioisotopen-Laborat. | | (1961) |
| 45) | K.Schwabe | Fortschritte der pH-Messtechnik | | (1958) |
| 46) | J.Fernandez | Mitteilung, Frankfurt/M | | (1962) |
| 47) | L.S.Kassel | Amer. Chem. Soc. | 57,150 | (1932) |
| 48) | V.V.Voedodsky,
V.N.Kondratiev | Progress in Reactions
Kinetics, Moskau | | (1961) |
| 49) | A.A.Frost,
R.G.Pearson | Kinetik und Mechanismen. Deutsche Auflage | | (1964) |
| 50) | R.Poroschin,
T.Kosarenko | Prol.Alad.Sci. Lect.Ch. USSR | 109,401 | (1956) |
| 51) | M.Bergmann,
A.Miekeley | Hoppe-Seyl.Z.physiol.Ch. | 140,128 | (1924) |
| 52) | P.Desnuelle,
A.Casal | Biochim. et Bioph.Acta | 2,64 | (1948) |
| 53) | P.Desnuelle,
M.Rovery,
G.Bonjour | Biochim. et Bioph.Acta | 2,134 | (1948) |
| 54) | S.J.Leach | Trans. Faraday Soc. | 49,915 | (1953) |

L e b e n s l a u f

Am 21. Juni 1931 wurde ich, Pablo Martinez Las Marias, als Sohn des Kaufmanns Pedro Martinez und seiner Ehefrau Maria geb. Las Marias in Barcelona (Spanien) geboren.

Von 1937 bis 1942 besuchte ich die Volksschule in Barcelona und von 1942 bis 1949 die Oberschule "Instituto Nacional J. Balmes" in Barcelona. Das Examen de Estado, der deutschen Reifeprüfung entsprechend, legte ich im Oktober 1949 an der Universität zu Barcelona ab.

Nach Abschluss der Oberschule begann ich 1950 mein Studium an der Universität zu Barcelona in der naturwissenschaftlichen Fakultät mit dem Hauptfach Chemie. 1956 bestand ich das Examen de Licenciatura en Ciencias, Seccion de Quimicas, das der deutschen Diplomprüfung für Chemiker entspricht.

In dem folgenden Jahr absolvierte ich meinen Militärdienst.

Seit 1958 studierte ich an der Universität zu Frankfurt am Main, wo ich meine durch Nebenverdienst finanzierte Doktorarbeit im Institut für physikalische Chemie unter der Leitung von Herrn Professor Dr. H. Hartmann begann.

